

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Detección de cepas patógenas de *Escherichia coli* en
alpacas neonatas y niños pastores**

TESIS

Para optar por el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Rocio Rimac Beltrán

Lima – Perú

2015



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
Facultad de Medicina Veterinaria
ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N° 117-EAPMV/FMV-2015

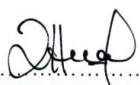
PRESIDENTE :


SONIA CALLE ESPINOZA

MIEMBROS :


RAÚL ROSADIO ALCÁNTARA
Asesor de la Tesis


NORMA NOÉ MOCCETTI


WILFREDO HUANCA LÓPEZ

San Borja, 18 de setiembre de 2015

V° B°


MV. Mg. HERMELINDA RIVERA GERÓNIMO
Directora de la Escuela Académico Profesional de
Medicina Veterinaria





UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el auditorio principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día viernes **18 de setiembre de 2015**, a las **11:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° 117-EAPMV/FMV-2015, integrado por los siguientes profesores:

SONIA CALLE ESPINOZA	Presidente del Jurado
RAÚL ROSADIO ALCÁNTARA	Asesor de la Tesis
NORMA NOÉ MOCCETTI	Miembro del Jurado
WILFREDO HUANCA LÓPEZ	Miembro del Jurado

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, la Bachiller Doña: **RIMAC BELTRÁN, ROCÍO**, para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

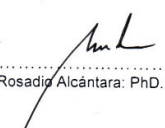
"DETECCIÓN DE CEPAS PATÓGENAS DE *Escherichia coli* EN ALPACAS NEONATAS Y NIÑOS PASTORES"

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECIOCHO (18)**.

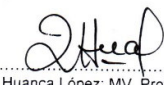
Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **11:55 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:


Sonia Calle Espinoza: Mg. Prof. Principal, D.E.


Raúl Rosadio Alcántara: PhD. Prof. Principal, T.C.


Norma Noé Moccetti: MPH. Prof. Principal, D.E.


Wilfredo Huanca López: MV. Prof. Asociado, D.E.



DEDICATORIA

Este estudio va dedicado a la familia Rimac Beltrán
y a Luis H. Cusihualpa Quispe y familia

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Raúl Rosadio y al Dr. Lenin Maturrano por sus conocimientos y enseñanzas.

A la vez, se agradece al equipo de la Unidad de Biología y Genética Molecular: Raquel Hurtado, Luis Luna, Karol Guzmán, Nidia Puray y David Janampa.

El presente estudio fue financiado del Fondo de Innovación, Ciencia y Tecnología (FINCyT) del proyecto N°133-IB-2013: “Vacunología Reversa: Desarrollo de una Vacuna de Nueva Generación para el control y/o prevención de la neumonía pasteurolosica en alpacas”

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE CUADROS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE ANEXOS	v
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Taxonomía.....	3
2.2 Introducción	3
2.3 Principales patotipos causante de diarrea por <i>Escherichia coli</i>	6
2.3.1 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC).....	6
2.3.1.1 Enterotoxinas	6
2.3.1.2 Toxina Termoestable-A (sta)	7
2.3.1.3 Toxina Termoestable-B (stb).....	8
2.3.1.4 Toxina Termolábil (lt)	8
2.3.1.5 Patogénesis	9
2.4 <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	10
2.4.1 Toxina shiga (Stx).....	10
2.4.2 Patogénesis.....	11

2.5	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC).....	12
2.5.1	La Lesión AE.....	13
2.5.2	Patogénesis	14
2.6	La supervivencia en el medio ambiente.....	15
2.7	La supervivencia en agua y epidemiología.....	16
2.8	<i>Escherichia coli</i> en Humanos	17
2.8.1	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC).....	17
2.8.2	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC).....	19
2.8.3	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC).....	21
2.9	<i>Escherichia coli</i> en el Perú.....	21
2.10	<i>Escherichia coli</i> en Alpacas.....	25
2.11	Identificación por PCR	27
2.12	Etapas de la PCR	27
2.12.1	Desnaturalización	27
2.12.2	Hibridación	27
2.12.3	Extensión	28
III	MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1	Lugar del Estudio.....	29
3.2	Toma y procesamiento de muestras.....	29
3.2.1	Niños y Animales.....	29
3.2.2	Recolección de muestras.....	29
3.2.3	Reactivación, Aislamiento e Identificación de <i>Escherichia coli</i>	30
3.3	Genotipificación	30

3.3.1	Extracción de ADN bacteriano	30
3.3.2	PCR múltiple	31
3.3.3	Determinación de los patotipos de <i>Escherichia coli</i>	33
IV.	RESULTADOS.....	35
V.	DISCUSIÓN	40
VI	CONCLUSIONES	44
VII.	RECOMENDACIONES.....	45
VIII.	LITERATURA CITADA	46
IX	ANEXOS	66

RESUMEN

Escherichia coli es parte de la flora normal de los intestinos de los mamíferos, sin embargo, hay cepas más agresivas denominadas patógenas debido a presencias de factores de virulencias. Este patógeno se clasifica en 6 patotipos: *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* difusamente adherente (DAEC), responsables de cuadros diarreicos tanto en animales como en los humanos. Las alpacas, principal recurso económico de las comunidades andinas, sufren de diarreas asociadas a *E. coli* patógenas y son manejadas por pastores y su familia en estrecho contacto principalmente en la época de parición. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la presencia de cepas potencialmente patógenas en muestras fecales de alpacas neonatas y los niños dedicados a su crianza evaluando, en 7 familias, la presencia de tres patotipos de *E. coli* (ETEC, EHEC, EPEC). Para lo cual se analizaron muestras de heces no diarreicas en 72 alpacas neonatas y 12 niños. Al análisis de las 72 alpacas neonatas muestreadas, 40 animales presentaron al menos un patotipo de *E. coli*. En 33 de estos 40 animales se aislaron cepas EPEC clasificadas como típicas (n=6), atípicas (n= 18) y en 9 animales restantes se recuperaron ambos tipos de cepas típicas y atípicas. De 7/40 animales se aislaron cepas EHEC, 4 de estos 7 animales fueron cepas EHEC y de los restantes 3 se aislaron combinaciones de cepas EHEC y EPEC típicas y atípicas. En 3 de las 7 familias se detectaron 4 niños positivos a algún patotipo de *E. coli*. En uno de ellos se aislaron cepas EHEC y ETEC, en dos EPEC típica y uno EPEC atípica. Estos resultados sugieren a la alpaca como reservorio de cepas patógenas de *E. coli* con la posibilidad de transmitirlo al ser humano.

Palabras clave: *Escherichia coli*, diarrea, niños pastores, alpaca

ABSTRACT

Escherichia coli is part of the normal flora of the intestine of mammals, however, there are aggressive strains denominated pathogens due to the presence of virulence factors. This pathogen is classified in 6 pathotypes: enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC) and diffusely adherent *E. coli* (DAEC) responsables of diarrheas in both animals and humans. Alpacas are the principal economic resource of the Andean communities, they suffer of diarrhea associated with pathogenic *E. coli* strains and they are raised by shepherds and their families in close contact mainly in the breeding season. The objective of this study was to evaluate the presence of potentially pathogenic strains in stool samples from neonatal alpacas and children involved in their upbringing, in 7 families, the presence of three pathotypes of *E. coli* (ETEC, EHEC, EPEC). Stool samples not diarrheal were tested from 72 neonatal alpacas and 12 children. The analysis of the 72 neonatal alpacas, 40 animals had at least one pathotype of *E. coli*. In 33 of these 40 animals had isolated typical EPEC strains (n = 6), atypical (n = 18) and 9 remaining animals were isolated both typical and atypical strains. At 7/40 animals from EHEC, 4 strains of these 7 animals were EHEC strains and the remaining 3 were isolated EHEC strains and combinations of typical and atypical EPEC. In 3 of the 7 families were detected children positive for at least one pathotype *E. coli*. One child was positive to ETEC and EHEC strains, two children with typical EPEC and one child typical EPEC. These results suggest the alpaca like a reservoir of pathogenic strains of *E. coli* with the possibility of transmission to humans.

Keywords : *Escherichia coli*, diarrhea, shepherd children, alpaca

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Título	Pág.
1	Cebadores empleados en la PCR múltiple	32
2	Patotipos de <i>Escherichia coli</i> según los cebadores	34
3	Relación de Patotipos de <i>E. coli</i> aislados por alpaca	36
4	Aislados de cepas patógenas de <i>E. coli</i>	36
5	Relación de cepas patógenas de <i>E. coli</i> de acuerdo a la edad del animal..	38
6	Relación de niños positivos a algún patotipo de <i>E. coli</i>	39
7	Relación de cepas aisladas de niños	39

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Pág.
1	Calidad de ADN de <i>E. coli</i> de muestras de heces de Alpacas.....	31
2	PCR múltiple de las cepas <i>E. coli</i> aisladas de alpacas y niño.....	37
3	Clasificación de las cepas EPEC por PCR múltiple aisladas de alpacas y niño.	37

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1: Relación de número de animales y niños positivos a cepas patógenas de <i>E. coli</i> por familia.	66
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

I. INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es parte de la flora normal de los intestinos de los mamíferos, sin embargo, hay cepas más agresivas denominadas patógenas debido a presencias de factores de virulencias (Whitehead *et al.*, 2006). Este patógeno está clasificado en 6 patotipos, de acuerdo a factores de virulencias, y mecanismos para inducir la diarrea: *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteoagregativa (EAEC) y *E. coli* difusamente adherente (DAEC) (Kaper *et al.*, 2004).

Las cepas patógenas de *Escherichia coli* son causantes del 30% de diarrea en niños en países en desarrollo (O'Ryan *et al.*, 2005). En Arizona hubo un brote de EHEC serotipo O157:H7 en dos niños que habían visitado un zoológico y fue asociada con contacto humano-animal. (CDC, 2005). Actualmente en el Perú, las cepas EPEC, EAEC y ETEC son los patotipos más frecuentemente detectados en niños con diarrea (Ochoa *et al.*, 2011). En otro estudio, la ETEC fue el patotipo más detectado en el 16% de 381 niños con diarreas en Lima (Cama *et al.*, 1999).

Huapaya *et al.* (2001) reportaron el primer aislamiento de *E. coli* O157:H7 utilizando la técnica de PCR para identificar el gen *stx2* en un lactante menor de 11 meses de edad que presentó un cuadro de diarrea disintérica en Tacna, Perú. Este sería el primer caso confirmado por prueba molecular y publicada en el país.

Los camélidos sudamericanos son el principal recurso económico para las comunidades andinas del Perú, donde las personas viven en condiciones de pobreza o extrema pobreza. Estas comunidades, además poseen el 80% de la totalidad de una población de alpacas estimada en 4 millones (Ameghino y DeMartini, 1991) cuya explotación es destinada principalmente para la producción de fibra y carne (Bustinza *et al.*, 1998; Fernández-Baca, 2005). Sin embargo, la productividad es afectada por altas mortalidades neonatales principalmente entéricas (50% - 80%) (Ameghino y DeMartini, 1991; Wheeler, 1991; Bustinza, 2001).

Investigaciones iniciales sobre agentes causales de procesos diarreicos en alpacas identificaron cepas patógenas de *E. coli* del patotipo ETEC productores de la toxina termoestable (St) y toxina termolábil (Lt) (Ellis *et al.*, 1983; Ramírez, 1991). En recientes investigaciones, sin embargo, las cepas EPEC y EHEC fueron detectadas con mayor frecuencia en alpacas neonatas con diarrea y con muerte súbita (Luna *et al.*, 2012; Cid *et al.*, 2010). El serotipo de mayor importancia en salud pública (O157), ha sido reportada en nuestro país (Cordero *et al.*, 2009) y también en Reino en muestras de heces de alpacas (Featherstone *et al.*, 2011).

Las cepas patógenas de *E. coli* aisladas en el Perú proceden mayormente de animales sin signos de diarreas y la presencia de cepas EPEC o EHEC en estos animales podrían indicar que la alpaca serían reservorios de cepas patógenas y ser fuente de infección para el hombre (Mori *et al.*, 2014; Silvera *et al.*, 2012).

Por estas razones, el objetivo del presente estudio fue investigar la detección de tres cepas patógenas de *E. coli* (EPEC, ETEC y EHEC) en alpacas y niños pastores dedicados a su crianza.

II. REVISION BIBLIOGRÁFICA

2.1. TAXONOMÍA

La clasificación taxonómica según el Manual *Bergey's* (Garrity *et al.*, 2004), de *Escherichia coli* es:

Dominio: *Bacteria*

Phylum: *Proteobacteria*

Clase: *Gammaproteobacteria*

Orden: *Enterobacteriales*

Familia: *Enterobacteriaceae*

Género: *Escherichia*

Especie: *Escherichia coli*

2.2. INTRODUCCIÓN

Escherichia coli fue identificada por primera vez en 1885 y nombrado *Bacterium coli commune* por el Dr. Theodor Escherich, un pediatra alemán (Escherich, 1885). Él identificó la bacteria a través de estudios de la flora intestinal de niños. Más tarde, la bacteria fue encontrada de tener propiedades patógenas que implican infección extraintestinal (Escherich, 1894). Hasta 1919, el nombre de *Bacterium coli* fue ampliamente utilizado y luego Castellani y Chalmers definieron el género *Escherichia* y estableció la especie tipo *E. coli* (Castellani y Chalmers, 1919).

Escherichia coli es una bacteria gram negativa, fermentativa, en forma de bacilos (2.0-6.0 um de largo y 1.1-1.5 um de ancho) con extremos redondeados. *Escherichia coli* no es formadora de esporas, y generalmente es móvil a través de la acción de flagelos peritricos. *Escherichia coli* es anaerobio facultativo y produce gas a partir de la fermentación de carbohidratos, como se ve por la producción de ácido y gas a partir de la lactosa a 37°C y 44°C.

Además, la producción de sulfuro de hidrógeno no es normalmente evidente cuando *E. coli* se cultiva en agar hierro triple azúcar (TSI) o agar hierro de Kligler (KIA). *Escherichia coli* también no induce licuefacción de la gelatina a través de la actividad gelatinasa (Percival *et al.*, 2014). Otras características que son útiles en su identificación incluyen una reacción indol positivo, negativa a la producción de ureasa y la falla en utilizar citrato como única fuente de carbono. Aunque ampliamente superados en número por las bacterias anaeróbicas, *E. coli* es la principal bacteria anaerobia facultativa en el tracto intestinal de la mayoría de las especies animales y es típicamente presente en 10^7 - 10^9 organismos por gramo en heces. *E. coli* es por lo general el organismo dominante recuperado en cultivo aerobio de las heces (Gyles *et al.*, 2010).

El tracto intestinal estéril del animal recién nacido rápidamente se contamina con bacterias, incluyendo *E. coli*, de la microflora de la madre y del medio ambiente. *E. coli* se establece rápidamente en el intestino y permanece como parte de la flora normal de toda la vida del animal. La concentración de *E. coli* es baja en la parte superior del intestino delgado pero aumenta progresivamente, con concentración máxima en el intestino grueso (Gyles *et al.*, 2010). Hay por lo menos seis principales patotipos diarrogénicas de *E. coli* (otros dos patotipos *E. coli* extraintestinales (exPEC) están vinculados con infecciones del tracto urinario y meningitis neonatal) y cada tipo combina alguna forma de unión inicial a la célula hospedera con efectos adversos subsecuentes, ya sea a través de la elaboración de una toxina, o la acción directa (Croxen y Finlay, 2010). Estos tipos de *E. coli* incluyen la *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), junto con *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* difusamente adherente (DAEC). Cada tipo específico provoca enfermedades diarreicas a través de diferentes

mecanismos y cada enfermedad se presenta con variadas manifestaciones clínicas (Percival *et al.*, 2014).

La serotipificación es un método bien establecido que está basado en las diferencias de los antígenos O, K, y H determinados por la porción de polisacárido del lipopolisacárido (LPS), polisacárido capsular, y las proteínas flagelar, respectivamente (Scheutz *et al.*, 2004). Los antígenos K no son determinados de manera rutinaria y la serotipificación generalmente implica la determinación de antígenos O y H. Actualmente, hay 174 antígenos O (O1 - O181, con grupos O 31, 47, 67, 72, 93, 94, y 122 eliminados) y 53 antígenos H (H1 - H56, con 13, 22 y 50 no asignado) en el esquema de tipificación internacional. Cada vez más, métodos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) están siendo desarrollados para la detección de los genes que son específicos para varios antígenos importantes de O y H (Prager *et al.*, 2003). Otros procedimientos que se utilizan para caracterizar aislamientos incluyen la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) y el análisis de factores de virulencia (Gyles *et al.*, 2010).

La detección de factores de virulencia que son únicos o asociados con tipos particulares de cepas patógenas de *E. coli* es importante para la identificación y caracterización de *E. coli* patógenas. Como se mencionó anteriormente, el termino patotipo, o menos comúnmente patovar, se utiliza para identificar los tipos de *E. coli* sobre la base de su mecanismo de virulencia (Levine 1987; Nataro y Kaper 1998; Milon *et al.*, 1999) como se indica por la presencia de genes de virulencia que caracterizan el proceso por el cual la enfermedad es causada. Este sistema identifica amplias clases de *E. coli* patógenas, tales como ETEC, EPEC, EHEC (Gyles *et al.*, 2010).

2.3.PRINCIPALES PATOTIPOS CAUSANTES DE DIARREA POR *Escherichia coli*

En el presente estudio se ha hecho énfasis en 3 patotipos por su mayor prevalencia y como causantes de problemas entéricos, principalmente en animales jóvenes y como riesgo potencial de problemas de salud pública: *E. coli* enterotoxigenica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), el cual está muy relacionada con diarrea infantil y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), que es el más patógeno, pudiendo causar epidemias y muerte de individuos afectados, este tipo ha sido muy estudiada por ser un problema de salud pública, siendo muchos animales, entre ellos el vacuno y ovino, los principales reservorios de esta cepa (Caprioli *et al.*, 2005).

2.3.1. *Escherichia coli* ENTEROTOXIGENICA (ETEC)

Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) causa gastroenteritis con diarrea acuosa profusa acompañada de calambres abdominales. La sangre, pus y moco están generalmente ausentes en la diarrea y el vómito y fiebre son rara vez evidentes. ETEC induce la enfermedad a través de la producción de dos enterotoxinas, una toxina termoestable y una toxina termolábil, que afectan tanto el transporte de electrolitos como resultado en la pérdida excesiva de líquidos. La gravedad de la enfermedad varía considerablemente, de la enfermedad relativamente leve y de corta duración a enfermedad de severa amenaza a la vida. La dosis infecciosa es alta, con aproximadamente 10^6 organismos requeridos para causar la infección. El período de incubación asociado con la infección de este grupo de *E. coli* es 12-72 horas, con duración de la enfermedad a menudo 3-5 días (Percival *et al.*, 2014). A continuación se describirá los factores de virulencia de mayor importancia en ETEC.

2.3.1.1. ENTEROTOXINAS

Dos clases principales de enterotoxinas son producidos por ETEC (Gyles 1994; Turner *et al.*, 2006): toxina termoestable (ST), y toxina termolábil (LT). Ambos tipos de enterotoxinas son codificados por plásmidos. ST ha sido más caracterizada como STa (o STI) y STb (o STII) basados en el tamaño, estructura molecular y actividad biológica.

LT es altamente antigénica, considerando ST poco antigénico. Las enterotoxinas provoca alteraciones en el metabolismo de fluido intestinal pero no producen lesiones patológicas o cambios morfológicos en la mucosa intestinal (Gyles *et al.*, 2010).

2.3.1.2. TOXINA TERMOESTABLE-A (STa)

STa (también llamado STI) es un péptido aminoácido transportado a través de la membrana interna, plegada en el periplasma, luego secretada a través de TolC. STa ha sido designado STaP (producido por bovino, porcino, y ETEC humano) o StaH (producido por ETEC humano), basado en diferencias menores en la composición. STa se une a un receptor de glicoproteína guanilato ciclasa C (GC - C) en las criptas y vellosidades de las células epiteliales intestinales y activa la guanilato ciclasa, que estimula la producción de GMP cíclico (GMPc) (Giannella y Mann 2003; Turner *et al.*, 2006.; Al - Majali *et al.*, 2007). Los niveles elevados de GMPc en la célula activa GMPc dependiente de proteína quinasa II (cGKII) que resulta en la fosforilación del canal de cloruro. La activación resulta en la secreción de Cl^- y HCO_3^- , así como la inhibición de la absorción de Na^+ . Basado en la concentración y afinidad de los receptores Sta, el yeyuno posterior parece ser el sitio principal de la hipersecreción en respuesta a la STa. Hay buena evidencia de que STa se une a otros receptores y que cuenta con otras actividades, pero su relación con la diarrea no se conoce (Sellers *et al.*, 2008).

Los efectos de STa son reversibles. STa está activo en ratones lactantes y cerdos jóvenes, pero es menos activo en cerdos de mayor edad, consecuente con la disminución de afinidad y la densidad de los receptores STa al aumentar la edad. No es sorprendente que las cepas de ETEC que producen STa como la única enterotoxina estén asociadas con la enfermedad en cerdos, terneros y corderos neonatales. El gen que codifica Sta, *estA*, tiene un contenido de AT de 70% y se asocia con transposones que son portados por plásmidos (Gyles *et al.*, 2010)

2.3.1.3. TOXINA TERMOESTABLE-b (STb)

STb (también llamado STII) es un péptido de aminoácidos que no está relacionada con STa en composición y mecanismo de acción (Dubreuil., 1997). STb es sintetizado como un precursor que se libera en el periplasma donde se convierte a una forma activa. Se exporta cruzando la membrana externa a través de la proteína externa de membrana TolC y proteínas accesorias. ETEC productoras de STb se asocian principalmente con los cerdos y la mayoría de ETEC porcinos producen STb (Gyles *et al*, 2010). El receptor de las células del epitelio intestinal que se une a STb ha sido identificado como sulfatide (Beausoleil *et al.*, 1999; Gonçalves *et al.*, 2008). STb no altera los niveles de GMPc o AMPc en células de la mucosa intestinal, diferenciándose de este modo en el mecanismo de acción de STa y LT-I. La unión de STb a su receptor conduce a la captación de Ca^{2+} en la célula, activando la proteína quinasa C. Elevado los niveles de Ca^{2+} inducen la secreción de agua duodenal y yeyunal y electrolitos por mecanismos desconocidos (Harville y Dreyfus., 1995).

STb permeabiliza las células epiteliales intestinales *in vitro*, sin matarlos. *In vivo*, STb causa la pérdida de las vellosidades de las células epiteliales y en algunos, atrofia de las vellosidades. STb es inactivada por la tripsina, y en presencia de inactivador de tripsina, está activo en los intestinos de los ratones, ratas, y vacas. Aunque ETEC produciendo sólo STb puede inducir diarrea en cerdos jóvenes (Fairbrother *et al.*, 1989), su asociación con cerdos post-destete y datos experimentales indica que STb es probable que sea de vital importancia en los animales más viejos. El gen estB que codifica STb es portado en plásmidos (Erume *et al.*, 2008).

2.3.1.4. TOXINA TERMOLÁBIL (LT)

Dos subtipos de LT (LT-I y LT-II), se han descrito. LT-I es muy similar a la toxina del cólera (CT), tanto estructural como funcionalmente. LT-I es transportado a través de la membrana externa por una vía altamente homóloga al sistema de secreción tipo II (T2SS) para la secreción de CT (Tauschek *et al.*, 2002). Se une al LPS y se asocia con vesículas de membrana externa. Tanto LT-I y el T2SS se encuentran en uno de los polos de la bacteria y hay

evidencia que la entrega efectiva de la toxina implica interacción íntima de la bacteria y la célula huésped (Dorsey *et al.*, 2006).

Después de la unión a su receptor de superficie celular específico, LT-I es internalizado por endocitosis mediada por receptor luego transportado de manera retrógrado al aparato de Golgi y el retículo endoplásmico (RE). Los altos niveles de AMPc en la célula activan el *Regulador* de la conductancia transmembrana de la *fibrosis quística* (CFTR) a través de la fosforilación por la proteína quinasa A (Viswanathan *et al.*, 2009). La apertura de este canal anión resulta en el aumento de la secreción de iones de Cl^- y HCO_3^- . También hay disminución de la absorción de iones Na^+ . El efecto de LT-I es irreversible y el enterocito afectado permanece como un hipersecretor de AMPc hasta que se extrude. La secreción excesiva de electrolitos y agua conduce a la deshidratación, acidosis metabólica, y posiblemente la muerte (Nataro y Kaper, 1998). ETEC (positiva LT) típicamente producen fimbria K88 y STb, lo que sugiere que puede haber una conexión funcional entre estos factores de virulencia. Estudios recientes han demostrado que la LT promueve la adhesión de ETEC *in vitro* e *in vivo* (Berberov *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2009). LT puede también inducir la apoptosis de las células linfoides, aparentemente por medio de diferentes mecanismos dependiendo de la etapa de diferenciación de estas células (Tamayo *et al.*, 2009). Se han realizado pocos estudios sobre la ocurrencia de ETEC positivo LTII pero ETEC con los genes para LTII han sido aislados de los seres humanos, vacas, búfalos, cerdos y avestruces. Las enterotoxinas LTII comparten propiedades inmunomoduladoras de LTI pero difieren en sus uniones específicas.

PATOGENESIS

E. coli enterotoxigénica (ETEC) entra en el animal por vía oral, y cuando están presentes en número suficiente, colonizan el intestino delgado seguido de la fijación por adhesinas fimbriales a los receptores en el epitelio del intestino delgado. ETEC prolifera rápidamente para alcanzar números masivos de 10^9 por gramo en el intestino en los mediados de yeyuno al íleon. ETEC se adhiere estrechamente al epitelio intestinal y produce enterotoxinas

que estimulan la secreción de agua y electrolitos en el lumen intestinal. Esto conduce a la diarrea si el exceso de fluido en el intestino delgado no se absorbe en el intestino grueso. ETEC causa diarrea acuosa severa, que puede conducir deshidratación, apatía, acidosis metabólica, y la muerte. En algunos casos, especialmente en cerdos, la infección puede progresar tan rápidamente que la muerte ocurre antes del desarrollo de la diarrea, y se conoce como colibacilosis entérico complicada por shock.

Este fenómeno se debe probablemente a la rápida liberación de grandes cantidades de LPS por la colonización ETEC. LPS estimula la sobreproducción de mediadores de la inflamación incluyendo el factor de necrosis tumoral (TNF) - α , interleucina (IL) - 1, e IL - 6, que causan estos síntomas (Whitfield *et al.*, 1994). Infecciones entéricas por ETEC también pueden resultar en septicemia secundaria y manifestaciones de ictericia, hemorragias petequiales en las membranas mucosas, y esplenomegalia acompañado por diarrea severa y deshidratación (Fairbrother y Ngeleka., 1994).

2.4. *Escherichia coli* ENTEROHEMORRAGICA (EHEC)

Este tipos de *E. coli* aislada de casos de diarrea hemorrágica por consumo mayormente de alimentos de origen animal contaminado, ha cobrado mucha importancia en los últimos años, recomendándose en muchos laboratorios de referencia, la vigilancia epidemiológica de este patógeno (Huguet *et al.*, 2002). El serotipo clásico de esta cepa es la *E. coli* O157:H7, implicado en brotes en humanos. Otra característica clave de esta etapa es su toxicidad en línea celular VERO (derivado celular de riñón de mono verde africano) (Konowalchuk *et al.*, 1977). A continuación se describirá los factores de virulencia más importante en EHEC.

2.4.1. TOXINA SHIGA (Stx)

Las dos principales toxinas Stx de *E. coli* son Stx1, que es idéntica a Stx de *Shigella dysenteriae*, y Stx2, que es 56% homóloga a Stx1. Las variantes de los dos tipos principales de Stx se han identificado basado principalmente en la composición de aminoácidos y las propiedades biológicas. Las diferencias en los reservorios animales, enfermedades de los

animales, y la gravedad de la enfermedad en los seres humanos se han relacionado con los distintos tipos de Stx (O'Loughin y Robins-Browne., 2001).

La inducción de fagos por agentes que afectan el ADN bacteriano o de la pared celular, incluidos los antibióticos, puede conducir a un aumento masivo de la producción de toxinas (Kimmitt *et al.*, 2000). La producción máxima de Stx *in vitro* se produce a 37°C. Típicamente, Stx se une con alta afinidad a su receptor glicolípid, globotriaosilceramida (Gb3), en la superficie de células epiteliales o endoteliales del hospedero, y es internalizado por endocitosis mediada por receptor. Siguiendo la transferencia retrógrada a través del aparato de Golgi, la toxina se asocia con el retículo endoplasmático rugoso, el cual es liberado en el citosol (Sandvig y Van Deurs 2002). Stx inducen vías de señalización que resultan en la apoptosis y la activación del factor nuclear κ B (NF - κ B), quinasas Src, y activador de la proteína-1 (AP-1) (Heyderman *et al* 2001).

La presencia de Gb3 en la superficie de las células es crítico para la susceptibilidad a Stx. Otros factores tales como la composición de ácidos grasos de Gb3, la internalización de los complejos toxina- receptor, y la degradación de la toxina internalizada también afecta la susceptibilidad celular (Lingwood *et al.*, 1998). Stx puede unirse a receptores de proteínas no caracterizados en la superficie de ciertas células epiteliales, pero el papel de estas proteínas en la captación de Stx es desconocido (Devenish *et al.*, 1998).

Líneas de células intestinales, tales como CaCo2 y T84 transfiere Stx desde la superficie dentro del citoplasma sin mostrar signos de citotoxicidad (Philpott *et al.*, 1997). Aunque el mecanismo de transferencia no se conoce, esta ruta es probable que sea importante en la internalización de Stx desde el lumen intestinal al compartimiento vascular. Hay evidencia reciente que Stx2 promueve la adhesión de EHEC O157: H7 a las células epiteliales *in vitro* y en el intestino de los ratones y cerdos. El mecanismo parece ser la estimulación de la producción del receptor intimina en la superficie de las células (Robinson *et al.*, 2006).

2.4.2. PATOGÉNESIS

E. coli enterohemorrágica (EHEC) produce toxinas tipo Shiga (llamados así debido a su similitud con las toxinas producidas por *Shigella dysenteriae*) que son citotóxicos para las células Vero. La más prevalente EHEC es la cepa denominada “O157”. La transmisión de estos organismos se cree que ocurre principalmente a través de alimentos contaminados. El período de incubación tras la ingestión de EHEC es de 3-8 días y la duración de la enfermedad es generalmente 1-12 días. Después de la ingestión de la dosis requerida que es <100 organismos, se desarrollan síntomas que incluyen diarrea acuosa y sangrienta. EHEC también causa colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico, siendo este último caracterizado por trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática y falla renal. Los síntomas que resultan de EHEC incluyen un dolor abdominal "cólico", seguida de diarrea con sangre, y en algunos casos vómitos. La pérdida de sangre es a menudo severa después de sólo unos días después de la infección (Percival *et al.*, 2014)

EHEC en el medio ambiente son ingeridos, pasan a través del estómago al intestino, donde colonizan y producen Stx. En EHEC positivo LEE, la formación de la lesión AE es una característica importante de la colonización intestinal. En EHEC negativo LEE, la unión de EHEC al epitelio se produce en un patrón no íntimo. Cantidades variables de la toxina son absorbidas dentro de la circulación y causan daño vascular en los órganos diana. Los factores que influyen en la producción y la absorción de la toxina en el intestino son en gran parte desconocida. Otros productos bacterianos, tales como LPS, pueden contribuir a la patología por la inducción de citocinas y la regulación positiva de receptores para Stx. (Gyles *et al*, 2010)

2.5. *Escherichia coli* ENTEROPATOGÉNICA (EPEC)

Mientras que el agua y los alimentos son instrumentos en la transmisión y propagación de *E. coli*, la dosis requerida para este patógeno para causar la infección es alta, típicamente en el intervalo de 10^6 - 10^9 organismos. EPEC están implicados como una causa de diarrea en varias especies de animales. Estas cepas inducen lesiones AE en la mucosa intestinal y son agrupadas en una categoría de *E. coli* llamado *E. coli* de adhesión y borrado (AEEC) (Nataro y Kapper, 1998).

Los genes que codifican las proteínas implicadas en el desarrollo de la lesión AE están agrupados en el LEE, primero descrito en cepas EPEC de humanos (Nataro y Kaper 1998). En EPEC humano, una adhesina fibrilar de adherencia difusa, EPEC Afa, parece funcionar como una adhesina inicial que es eventualmente eliminado de la región de contacto bacterias-hospedero para permitir la interacción de la intimina-Tir y formación de la lesión AE (Keller *et al.*, 2002). Muchos EPEC humanos poseen bundle forming pili (Bfp) tipo IV codificados por plásmidos, los cuales son responsables de la adhesión localizada de estas bacterias a las células HeLa *in vitro* (Girón *et al.* 1993) y se proponen para ser responsable de la adherencia inicial de bacterias entre sí y con la membrana apical del enterocito diana (Donnenberg *et al.* 1997).

2.5.1. La Lesión AE

Ciertos EHEC poseen el locus de borrado del enterocito (LEE), una IPA cromosómico que codifica proteínas requeridas para un sistema de secreción de tipo III (SSTT), proteínas implicadas en la adherencia íntima de las bacterias al epitelio del hospedero, y las proteínas secretadas implicadas en la transducción de señales en la célula epitelial huésped (Nataro y Kaper, 1998; Dean y Kenny, 2009). Un componente crítico es la *eae* (*E. coli* de adhesión y borrado) gen que codifica la proteína de membrana externa intimina (Eae) que funciona como una adhesina. El gen *tir* codifica la translocación del receptor intimina (Tir), una proteína que se transporta a través de la SSTT en el citoplasma de la célula huésped y vuelve a aparecer en la superficie de la célula huésped, donde actúa como un receptor para la intimina (Sinclair *et al.*, 2006).

En respuesta a las proteínas efectoras que son inyectadas al enterocito, la célula huésped sufre una extensa reorganización del citoesqueleto, que implica la lisis de las microvellosidades, la formación de un pedestal, y la acumulación de actina y otras proteínas del citoesqueleto por debajo de las bacterias (Kaper *et al.*, 1998). Los cambios en la célula huésped incluyen aumento en los niveles intracelulares de calcio, la inhibición de la absorción de Na⁺ y Cl⁻, la estimulación de la secreción de Cl⁻. Finalmente el aparato en forma de aguja del SSTT se pierde y la intimina y Tir se unen para efectuar el contacto íntimo entre las bacterias y la célula huésped. La

activación de NF - κ B resulta en la síntesis de IL - 8 y atracción de leucocitos polimorfonucleares (PMN) que migran entre las células epiteliales dentro del lumen intestinal.

2.5.2. PATOGÉNESIS

EPEC se adhiere a las células epiteliales intestinales, probablemente por medio de adhesinas específicas como AF/R1, AF/R2 y Ral en el conejo, y bfp en el perro. Las adhesinas bacterianas involucradas en este paso no han sido bien caracterizados en EPEC de especies animales distintas al conejo. Una señal es luego liberada desde las bacterias a las células epiteliales, probablemente a través de la SSTT y proteínas secretadas (Viswanathan *et al.* 2009).

La señal resulta en aumento de los niveles intracelulares de calcio, la fosforilación de ciertas proteínas de las células epiteliales y la activación de quinasas y de la actividad de unión al receptor Tir. El resultado es una unión bacteriana íntima a las células epiteliales debido al reconocimiento de Tir y los receptores de la célula huésped por la intimina bacteriana, y cambios del citoesqueleto, tales como acumulación de la actina polimerizada directamente debajo de las bacterias adheridas. Hay un posterior borrado de microvellosidades en la proximidad de la unión bacteriana y las bacterias son observadas a menudo posarse en una estructura como pedestal que puede extenderse desde la célula epitelial en una estructura como pseudópodo. La actividad de señalización también resulta en una afluencia de neutrófilos PMN en el sitio de la adherencia bacteriana.

Los mecanismos por los que EPEC inducen diarrea no se conocen bien. La pérdida de absorción de las microvellosidades por la lesión AE podría conducir a la diarrea debido a la mala absorción (Nataro y Kaper 1998). Sin embargo, la rápida aparición de la diarrea sugiere que un mecanismo secretor más activo también está involucrado y puede resultar del efecto de la actividad de señalización de EPEC sobre los mediadores intracelulares de transporte de iones intestinal, tales como calcio, fosfatos de inositol, y la tirosina quinasa. El desarrollo de la diarrea también puede ser debido, en parte, a un aumento de la permeabilidad de las uniones estrechas

entre las células epiteliales, una respuesta inflamatoria localizada en el sitio de la lesión, seguido de una trans migración de leucocitos PMN.

2.6.LA SUPERVIVENCIA EN EL MEDIO AMBIENTE

El reservorio natural de *E. coli* es el intestino de los seres humanos y otros animales de sangre caliente. Aunque *E. coli* sobrevive en el medio ambiente, no parece crecer y finalmente morir. Como consecuencia de ello, la presencia en el medio ambiente se toma como una indicación de contaminación fecal (Feachem *et al.*, 1983).

Escherichia coli tiene importancia en bacteriología del agua, ya que proporciona un marcador útil de la contaminación fecal y no a causa de su patogenicidad intrínseca. La teoría es que si *E. coli* está presente, entonces otras bacterias entéricas potencialmente patógenas también. A pesar de las preocupaciones sobre la fiabilidad de *E. coli* como marcador de la seguridad en el agua, sigue siendo la única especie que casi todas las muestras de rutina se ponen a prueba (Gleeson y Gray, 1997).

Desde el tracto intestinal, *E. coli* puede causar una variedad de enfermedades, pero las cepas responsables, así como los que causan la enteritis en los seres humanos y mamíferos, se caracterizan por la presencia de factores de virulencia específicos. Las infecciones con dichas cepas se desarrollan ya sea por la vía endógena, o a través de la diseminación en los hospitales a través de equipo contaminado y por manos de personal de salud.

Se han notificado casos de infección por *E. coli* asociados con el tratamiento del agua contaminada, y el agua potable. (Dev *et al.*, 1991; Swerdlow *et al.*, 1992; Chalmers *et al.*, 2000). Los bovinos infectados en granjas son sospechosos de causar la contaminación del agua con *E. coli* (Gyles, 2007; Johnson, 2003; Johnson *et al.*, 2003) y el agua de riego se ha notificado de ser una fuente de contaminación (Watchel *et al.*, 2002a, 2002b). Un estudio realizado por Kerr *et al.* (1999) determinaron que la *E. coli* O157: H7 fue capaz de sobrevivir durante largos periodos en el agua mineral embotellada comercialmente. *Escherichia coli* O157

se ha detectado en el agua de pozo de cuatro sitios diferentes en Escocia, Reino Unido (Artz y Killham, 2002).

2.7.LA SUPERVIVENCIA EN AGUA Y EPIDEMIOLOGÍA

Todas las *E. coli* patógenas se adquieren directamente o indirectamente de portadores humanos o animales. Dada la sensibilidad de *E. coli* al cloro y otros desinfectantes, la cloración adecuada por lo general elimina eficazmente cualquier riesgo para la salud (Hunter, 2003).

Existe preocupación sobre el posible rol de las biopelículas sobre cómo actúan en la protección de *E. coli* patógenas. Las dosis muy altas infecciosas requeridos para toda *E. coli* patógena, distintos de EHEC, sugiere que esta posible vía de transmisión es poco probable como un riesgo. La dosis infecciosa baja de EHEC potencialmente aumenta el riesgo de infección de biopelículas en el agua, pero no ha habido brotes o casos esporádicos de EHEC implicados con el suministro de agua desinfectados adecuadamente. (Percival *et al.*, 2014).

Recientes investigaciones ha demostrado que *E. coli* puede sobrevivir en ambientes acuáticos, aunque los factores que contribuyen a la supervivencia, son poco conocidos. Alta prevalencia de *E. coli* O157 ciertamente se ha encontrado durante los periodos más cálidos (Hancock *et al.*, 1998). La exposición al agua recreacional, incluyendo el uso de las piscinas, se ha implicado como fuente de *E. coli* O157:H7 (Ackman *et al.*, 1997; Keene *et al.*, 1994), aunque la información sobre *E. coli* O157:H7 en aguas naturales y agua potable sigue siendo limitada, lo cual es debido principalmente al hecho de que a menudo este patógeno se este produciendo en concentraciones bajas (por debajo de los límites de sensibilidad de la detección) (Percival *et al.*, 2014).

En los Países Bajos, *E. coli* O157 fue aislado (utilizando un método de enriquecimiento específico) en 2,7% de los 144 pozos privados, a pesar de que estas muestras cumplan con los estándares de agua potable necesarios (Schets *et al.*, 2005). En Canadá, tras un estudio de 2 años llevado a cabo en la cuenca del Río Oldman, el 0,9% de las muestras de agua superficial (n = 1483) fueron contaminados con *E. coli* O157: H7 (Johnson *et al.*, 2003). En el agua de río, *E.*

coli O157:H7 también se ha aislado de la Cuenca del Río Oldman en el sur de Alberta, Canadá (Gannon *et al.*, 2004). *Escherichia coli* O157 fue encontrado en 33 muestras de agua de superficie en Baltimore, EE.UU., tras el uso de caldo de enriquecimiento y electroquimioluminiscencia inmunomagnética. Sin embargo, *E. coli* O157 sólo se encontró en bajas concentraciones de < 1 células por 100 ml de agua cruda (Shelton *et al.*, 2001).

2.8. *Escherichia coli* EN HUMANOS

La diarrea continúa siendo un problema importante de salud en el mundo, además es la tercera causa común de muerte en niños menores de 5 años de edad, lo que representa 1.87 millones de muerte por año, donde los patotipos de *E. coli* en conjunto son responsables del 30 al 40% de los episodios de diarrea aguda en niños y reconocidos como importante patógenos, aun en países en vías de desarrollo (O’Ryan *et al.*, 2005). Estas bacterias colonizan el intestino del ser humano, pudiendo transmitirse directamente de persona a persona, de animal a persona o indirectamente a través del agua o los alimentos contaminados (Nataro *et al.*, 1998).

2.8.1. *Escherichia coli* ENTEROTOXIGENICA (ETEC)

ETEC es una de las principales causas de muerte en niños menores de 5 años en los países en desarrollo. Adultos y niños mayores en los países tropicales también pueden infectarse por ETEC y generalmente se convierten en portadores asintomáticos, como resultado de la inmunidad de la mucosa. Las personas que no adquieren inmunidad desarrollan una condición conocida como diarrea del viajero que se manifiesta como breves episodios de diarrea a veces acompañados de náuseas, vómitos y dolores abdominales. La diarrea del viajero afecta hasta el 60% de las personas que van a los países tropicales y de ellos, unos 20 a 40% se producen debido a la ETEC. En los niños ecuatorianos de 7-10 meses de edad, hubo una asociación estadística entre el consumo de agua potable de baja calidad y anticuerpos para ETEC (Brüssow *et al.*, 1992).

Transmisión de persona a persona de ETEC no parece ser común y mayormente la transmisión de la enfermedad es esporádica a través de las fuentes de alimentos y agua. Hubo varios brotes hídricos debido a ETEC. Un brote particularmente grande afectó a más de 2000 empleados y visitantes a un parque nacional estadounidense en Oregon en el verano de 1975 (Rosenberg *et al.*, 1977). *E. coli* enterotoxigénica fue aislada de 20 (16,7%) de 120 muestras rectales examinados. Hubo una fuerte correlación entre la enfermedad y agua potable en el personal del parque y los visitantes ($p < 0,00001$). El único grupo en el que no hubo asociación con el agua potable del parque fue unos visitantes que comprendían del 7-9 de julio de 1975 cuando la cloración del suministro de agua fue monitoreada de cerca. El agua provenía de un manantial superficial que fue contaminada por un desbordamiento de aguas residuales algunos 650m cuesta arriba desde la primavera. Se suponía que el suministro fue tratado, pero no hubo un monitoreo sistemático de los niveles de cloro en todo el sistema de distribución (Percival *et al.*, 2014).

Otro brote reportado afectó a 251 pasajeros y 51 tripulantes en un crucero por el Mediterráneo (O'Mahony, 1986). *E. coli* enterotoxigénica fue aislado de 13 de 22 pasajeros y 6 de 13 tripulantes muestreados. Coliformes fecales fueron aisladas de agua corriente y agua potable de grifo fue el único factor de riesgo asociado con la enfermedad en un estudio de casos y controles ($p = 0.01$). Hubo varios defectos en el sistema de agua de la nave, incluyendo la posible cloración y cubiertas defectuosas. Los brotes fueron asociados con el consumo de bebidas con cubitos de hielo a bordo de la nave y también fueron asociados con el consumo de agua sin embotellar. Se sugirió que el agua en los puertos de ultramar era la fuente de la infección y que dicha agua debe ser tratada antes de su uso (Daniels *et al.*, 2000).

En otro brote fueron afectados 175 efectivos militares israelíes y al menos 54 civiles en los Altos del Golán. Una tubería de agua común suministraba todos los puestos militares afectados y las comunidades civiles. Las muestras de agua de varios puntos a lo largo del sistema de distribución mostraron cloración insuficiente y altas concentraciones de *E. coli*. (Huerta *et al.*, 2000).

2.8.2. *Escherichia coli* ENTEROHEMORRAGICA (EHEC)

EHEC se encuentra en los intestinos de varias especies animales, incluyendo en ganados. La infección de los seres humanos puede seguir propagación fecal-oral directa de animales infectados o de otros seres humanos, o estar relacionado con la contaminación de los alimentos o el agua. Muchos brotes han seguido el consumo de productos de carne, hamburguesas de carne particularmente mal cocido o productos para ensaladas. Varios brotes de EHEC han sido asociados con el contacto de agua recreativa y beber agua potable. Serotipo O157:H7 es la cepa EHEC notificada con mayor frecuencia en Europa y América del Norte y la única cepa ligada a brotes de enfermedades relacionadas con el consumo de agua. Sin embargo, las cepas de EHEC no O157 están siendo cada vez mas reconocidas como causas de brotes debidos a transmisión alimentaria y la transmisión de persona a persona (Percival *et al.*, 2014)

El primer brote de infección por *E. coli* O157:H7 que fue fuertemente vinculado al consumo de agua potable se produjo en Burdine Township, Missouri entre el 15 de diciembre de 1989 y 20 de enero 1990 (Swerdlow, 1992). De una población de 3126, un total de 243 personas desarrollaron la enfermedad y de éstos, 86 desarrollaron diarrea con sangre, 36 fueron hospitalizados y cuatro murieron. En un estudio de caso y control, en 53 casos, el único factor importante fue que las personas infectadas bebían más tazas de agua municipal por día (7,9) que otros individuos (6,1) ($p = 0,04$).

Un brote de *E. coli* O157:H7 en Grampian, Escocia, Reino Unido afectó a cuatro personas durante el caluroso verano de 1990 (Dev *et al.*, 1991). Las cuatro personas (tres chicos de entre 4, 8 y 9 años, y una mujer de 20 años de edad) desarrollaron colitis hemorrágica. El pueblo involucrado normalmente recibe su agua de un depósito situado en una colina en el pueblo. Sin embargo, debido al clima caliente este suministro era bajo y también se utilizó agua de dos depósitos auxiliares. Uno de estos depósitos se alimentó de una fuente que se parecía a un sistema de campo de drenaje que pudo haber sido contaminada por estiércol de vacuno.

Durante octubre de 1992, un gran brote de diarrea con sangre afectó a miles de personas en Sudáfrica y Suazilandia (Isaacson *et al.*, 1993). En algunas zonas, los casos fueron principalmente los hombres que bebían agua superficial en los campos, mientras que las mujeres y los niños que bebieron agua de pozo se salvaron. *Escherichia coli* O157:H7 se aisló del 14,3% de 42 muestras de estiércol de ganado y 18,4% de 76 muestras de agua recogidas al azar. El problema de fondo parece haber sido carcasas de ganado y el estiércol que se lava en los ríos por las fuertes lluvias tras un período de sequía. Un brote afectó a turistas internacionales que regresaban de Fuerteventura, Islas Canarias en marzo de 1977 (Pebody *et al.*, 1999). Catorce casos confirmados y un caso probable fueron identificados de cuatro hoteles. Tres de los cuatro hoteles fueron suministrados con agua de un pozo privado.

Un brote en Highland, Escocia, Reino Unido ilustró una serie de lecciones importantes (Licence, 2001). La fuente del brote fue un suministro privado de agua sin tratar y sin protección que vino de una zona donde se les permitió pastar animales. Seis personas fueron afectadas, todos los cuales eran visitantes de la zona. No ocurrieron casos en residentes permanentes. Este brote demuestra que la inmunidad a EHEC se puede desarrollar. También ilustra el riesgo de permitir a los visitantes a beber aguas de suministros privados donde los suministros están en zonas donde los animales pastan y no hay un tratamiento eficaz.

El brote más grande y más notorio de EHEC asociada con el agua potable se produjo durante mayo y junio del 2000 entre los residentes de Walkerton, Ontario, Canadá (Anon, 2000). Había aproximadamente 1346 casos de enfermos identificados, aunque muchas personas fueron infectadas con *Campylobacter* en lugar de EHEC. Además, 65 personas fueron ingresadas en el hospital de los cuales 27 desarrollaron SUH y hubo seis víctimas mortales. La enfermedad fue fuertemente asociada con el consumo de agua potable. El agua potable provenía de una serie de pozos y hubo una fuerte evidencia que sugiere que uno de los pozos se había contaminado con heces de ganado después de fuertes lluvias e inundaciones.

2.8.3. *Escherichia coli* ENTEROPATOGENA (EPEC)

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) fue reconocida por primera vez como una de las causas de diarrea infantil en la década de 1940, y se asoció con brotes en hospitales y guarderías en el Reino Unido. Durante uno de estos brotes, Bray (1945) preparó un antisuero de una cepa de *E. coli* aislada de un paciente con diarrea y utilizó este antisuero para demostrar que las cepas epidémicas pertenecían al mismo serogrupo, más tarde reconocido como *E. coli* O111. En 1987, la Organización Mundial de la Salud (1987) reconoció serotipos EPEC de 12 serogrupos O distintos (O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 y O158). Aunque los grandes brotes de diarrea infantil debido a EPEC han desaparecido en gran parte de los países industrializados, EPEC sigue siendo una causa importante de diarrea infantil potencialmente fatal en los países en desarrollo (Trabulsi *et al.*, 2002). En Brasil, por ejemplo, las cepas EPEC se recuperaron de hasta un 30% de los casos de diarrea en lactantes de bajo nivel socioeconómico (Gomes *et al.*, 1996). En Uruguay, *E. coli* patógenas son los agentes bacterianos más frecuentemente identificados asociados con gastroenteritis en niños en los grupos de población de bajos ingresos. Aunque el rotavirus se reconoce cada vez más como una causa frecuente de estas infecciones, EPEC todavía representa una vasta proporción de los casos de diarrea (Torres *et al.*, 2001). En un estudio, indican que cepas de EPEC atípicas podrían ser una causa significativa de infecciones humanas en España y confirma que, en países desarrollados, EPEC atípicas son más frecuentemente aislados de pacientes con diarrea (5.2%) de EPEC típica (0.2%) (Blanco *et al.*, 2006). Sin embargo, cepas EPEC atípicas han sido frecuentemente aislados de niños saludables (Beutin *et al.*, 2003; Pabst *et al.*, 2003), mas estudios son requeridos para establecer la significancia clínica de estos resultados.

2.9. *Escherichia coli* EN EL PERÚ

La diarrea en niños menores de cinco años de edad es la tercera causa principal de muerte a nivel mundial. Entre los distintos patógenos causantes de esta patología, los patotipos de *E. coli* son frecuentemente detectados y responsables del 30%-40% de diarreas agudas en niños (O’Ryan *et al.*, 2005).

Investigaciones iniciales en nuestro país reportan cepas EPEC en niños con diarrea en un 4.2% (Salazar-Lindo *et al.*, 1993) resultados muy similares a lo obtenido (4.9%) por Lanata *et al.* (1992) pero distintos a los reportados por otros investigadores (Greenberg *et al.* 1991; Figueroa-Quintanilla *et al.* 1993; Castro Rodríguez *et al.* 1997) quienes obtienen tasas de infecciones mucho mayores (22%, 27% y 27.8%). Se observa, a la vez, variaciones en las frecuencias de este patotipo EPEC desde 11.7 % hasta 19.3% a través del tiempo (Salazar-Lindo *et al.*, 2000; Salazar-Lindo *et al.*, 2004). Además, se observó en el estudio realizado en 233 cepas aisladas de niños con diarreas en el laboratorio de Hospital de Emergencias Pediátricas de Lima, el 17.2% fueron cepas *E. coli* enteroagregativas (EAEC) y 1.3% EPEC (Arias *et al.*, 2004). En otros estudios, se trató de asociar ciertos patotipos de *E. coli* con diarreas persistentes y agudas en muestras obtenidas de 107 niños hospitalizados con diarreas persistentes y 1325 con diarreas agudas, todos menores de un año de edad, detectándose similares frecuencias para el patotipos EPEC (10.5% vs 10.1%) y EHEC (15.2% vs 14.5%) pero distintos para las ETEC (7.02% en grupo persistentes vs 15.2% de las agudas) (López *et al.* 1996).

Diversos estudios caso-control han sido realizadas para conocer el rol de las cepas patógenas de *E. coli* en cuadros diarreicos. Pazzaglia *et al.* (1991) analizaron muestras de heces de 391 niños (< 18 meses de edad) hospitalizados con diarreas agudas, obteniéndose un 11% EPEC y 9.5% ETEC, con mayor presencia de la toxina termolábil (*lt*) mayor que la toxina termoestable (*st*), y de 138 niños sin diarrea, no se logró determinar ningún patotipo.

En otro estudio en 1129 niños con diarreas y 744 niños sin diarreas fueron similarmente analizados para identificar solamente cepas ETEC, logrando detectarse 5.3% y 4.3% respectivamente, mayormente en niños mayores de un año de edad. Cuando se concentran en caracterizar estas cepas ETEC buscando diferenciar en presencia de una sola toxina (*Lt*, *St* o ambas), lograron identificar un mayor porcentaje cepas ETEC positivos solamente a la toxina termolábil (*Lt*) (52% de niños con diarrea y 72% en niños sin diarrea) y cepas ETEC positiva a la toxina *St* en 25% y 9% y cepas con las dos toxinas, 23% y 9% respectivamente (Rivera *et al.*, 2010).

Medina *et al.* (2010), siguiendo el tipo de estudio caso-control, analizaron niños infectados con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) para ver diferencia de patotipos en niños con y sin diarreas analizando 70 muestras de heces por grupo. Observaron una mayor frecuencia de cepas patógenas de *E. coli* en niños sin diarreas (26%) comparado con el 19% en el grupo con diarreas y las encontradas fueron: cepas EAEC (10% vs 6%), EPEC (10% vs 6%) y ETEC (3% vs 4%) respectivamente.

Se han realizado, igualmente, similares estudios de caso-control (diarreas vs no diarreas) en muestras de heces de niños mayores y menores de 6 meses de edad, buscando determinar la susceptibilidad de la edad con la presencia de cepas patógenas de *E. coli*. El análisis reportó cepas en las siguientes proporciones: EAEC (15.1% vs 17.9%), DAEC (4.6% vs 2.1%), EPEC (7.6% vs 9.9%), ETEC (3.2% vs 1.2%), EHEC (0.5% vs 1.2%). La presencia de cepas patogénicas es superior en niños mayores de 6 meses de edad. Las cepas EPEC atípicas fueron detectadas en mayor proporción que las EPEC típicas en ambos grupos con y sin diarreas. Al analizarse la totalidad de cepas ETEC, la presencia de la toxina termolábil (*Lt*) es más frecuente que la termoestable (*St*), y ambas. Entre las cepas EHEC las *stx1* y *eae* fueron las detectadas sin observarse cepas positivas a *stx2* (Ochoa *et al.*, 2009). En otro estudio, ejecutado en 120 cepas EPEC aisladas de niños con diarreas y sin diarreas, las EPEC atípicas fue común en ambos grupos 73% (54/74 diarreicas) y 87% (40/46 sin diarreas) (Contreras G *et al.*, 2010). Sin embargo, recientes estudios pediátricos evidencian que las cepas EPEC atípicas se encuentran significativamente asociadas con procesos diarreicas en países como Brasil y México (Araujo *et al.*; 2007; Moreno *et al.*; 2008; Estrada-García *et al.*, 2009). Huapaya *et al.* (2001) reportaron el primer aislamiento de la cepa EHEC (*stx2*) serotipo O157:H7 por la técnica de PCR en un lactante menor de 11 meses de edad quien presentó un cuadro de diarrea disintérica en Tacna. Este sería el primer caso confirmado por prueba molecular y publicada en el país.

Dado los reportes de cepas EHEC en niños con diarrea, Sakihara *et al.* (2001) realizaron estudios con el fin de conocer sobre sus características clínicas y factores de riesgo. Indican que

en el país se reportó 149 pacientes con SUH entre los años 1976 a 1996 atendidos en el Instituto Nacional de Salud del Niño. El 99% de los pacientes fueron menores de 5 años y de ellos el 85% menor de 2 años; en el 96% estuvo asociada a diarrea. Los casos clínicos se presentaron mayormente en primavera y verano (63%). La tasa de incidencia hospitalaria se ha incrementado progresivamente, con mayores presentaciones en el último quinquenio y solamente en el 33% de los casos termina en una insuficiencia renal aguda.

Siguiendo con las investigaciones en cepas EHEC, Contreras *et al.* (2011) reportan una baja prevalencia de cepas EHEC (0.4%) observadas en 14/3219 en casos de diarrea y 0.6% (15/2695) en el grupo control en niños menores de 3 años de edad. En los niños infectados no presentaron el SUH tampoco en el único caso que presentó diarrea sanguinolenta. El análisis de cepas EHEC reveló un 83% positivo a *stx1*, 17% a *stx2* y el 72% fueron también positivos a *eae* siendo el serotipo más común fue O26:H11 (14%). El autor concluye recomendando analizar cepas EHEC en niños con diarrea sanguinolenta y SUH.

Por ello, Llanos *et al.* (2012) examinaron 131 niños menores de 5 años de edad con cuadros diarreicos sanguinolentos en el Hospital Nacional Cayetano Heredia (HNCH), identificando cepas EHEC en un 9.2% y asociando la presencia de este patotipo con ausencia de fiebre, característica, según el autor, debe aumentar la sospecha de estas cepas en pacientes con diarrea sanguinolenta.

En otra investigación, con el fin de determinar la prevalencia de los seis patotipos de *E. coli*, analizaron un total de 8003 cepas aisladas de niños con diarreas (4243) y sin diarrea (3760). Los resultados fueron los siguientes: EAEC 9,9% vs 10.4%, EPEC 8,5% vs 10.9%, ETEC 6,9% y DAEC 4,8%. Los patotipos restantes estuvieron presentes en los dos grupos pero en porcentajes inferiores al 1% (Ochoa *et al.*, 2011).

La mayoría de estos estudios han sido realizados en centros hospitalarios de la Gran Lima pero muy pocos estudios provienen de zonas rurales ni se han evaluado a poblaciones que conviven estrechamente con animales productivos como las familias alpaqueras

2.10. *Escherichia coli* EN ALPACAS

Los camélidos sudamericanos son el principal recurso económico para las comunidades andinas del Perú, donde las personas viven en condiciones de pobreza o extrema pobreza. Estas comunidades, además poseen el 80% de la totalidad de una población de alpacas estimada en 4 millones (Ameghino y DeMartini, 1991) cuya explotación es destinada principalmente para la producción de fibra y carne (Bustinza *et al.*, 1998; Fernández-Baca, 2005). Sin embargo, la productividad es afectada por altas mortalidades neonatales principalmente entéricas (50% - 80%) (Ameghino y DeMartini, 1991; Wheeler, 1991; Bustinza, 2001).

Investigaciones iniciales sobre agentes causales de procesos diarreicos en alpacas identificaron cepas patógenas de *E. coli* del patotipo ETEC productores de la toxina termoestable (St) y toxina termolábil (Lt) (Ellis *et al.*, 1983; Ramírez, 1991). Posteriormente, Arainga *et al.* (2008), a partir de hisopados rectales de alpacas jóvenes con diarrea, detectaron cepas EHEC reportando la presencia del gen *stx1* (57%) y *stx2* (60%).

En investigaciones recientes, de 94 muestras de hisopados diarreicos neonatales, se detectaron 12.8% EPEC (en mayor cantidad de cepas EPEC atípicas) y 11.8% EHEC (Cid *et al.*, 2010). Esto contrasta con los resultados obtenidos por Luna *et al* (2012), que al analizar 27 hisopados rectales y 24 contenidos intestinales de crías muertas, obtiene un mayor porcentaje de cepas patógenas de *E. coli*: 70.4% de los hisopados clínicos y en 45.8% de los contenidos analizados. Estos mismos autores logran detectar un 94.7% cepas EPEC (mayormente EPEC típicas) y 3.7% EHEC (positivo al gen *stx2*) en crías padeciendo diarreas clínicas y 54.5% EPEC atípicas y 45.5% EHEC (mayor cantidad de *stx1*) en las crías muertas. En este mismo estudio ninguna de las cepas EHEC tenía el gen *eae*; sin embargo, las lesiones intestinales de las crías muertas con historia de diarreas correspondieron mayoritariamente a enteritis hemorrágica y se detectaron con frecuencias casi similares de cepas EHEC y EPEC.

Debido a los resultados anteriores, diversos estudios comenzaron a analizar crías de alpacas con o sin signos de diarrea para obtener mayor conocimiento sobre asociación de *E. coli* en los cuadros de diarrea, por ello Mori *et al* (2014) recolectaron 324 hisopados rectales de

alpacas de 60 días de edad procedentes de dos grupos, en similares cantidades, con y sin signos de diarreas, logrando obtener un total de 39 cepas patógenas (23 cepas EHEC y 16 EPEC atípicas) mayormente (34/39) de cuadros sin diarreas. En las crías con cuadros diarreicos, identificaron 3 cepas EHEC (una *stx1*, una *stx2* y una en combinación *stx2* y *hlyA*) y 2 EPEC atípicas contrastando con 20 cepas EHEC (mayormente *stx2* positivas) y 14 cepas EPEC atípicas de animales sin diarreas.

La presencia, en alpacas, de cepas EHEC O157 de mayor patogenicidad para humanos, ha sido investigada. Después de analizar 107 cepas en dos grupos de cepas obtenidas de alpacas con y sin diarreas, se detectaron 55 cepas de animales con diarreas y 52 cepas de animales sin diarreas. En el grupo diarreico se obtuvo 7 EPEC y 4 EHEC, y en el no diarreico, 5 fueron EPEC y 9 EHEC, sin lograr identificar la presencia del gen *rfbO157*. Sin embargo, en esta especie animal se ha logrado identificar el O157:H7 en nuestro país de animales aparentemente sanos (Cordero *et al.*, 2009) y en Gran Bretaña donde las alpacas compartían espacios con ovinos, equinos y cerdos que también resultaron positivos a este mismo serotipo, lo cual podría haber favorecido la diseminación de la *E. coli* O157 (Featherstone *et al.*, 2011).

A pesar que en muestras diarreicas reportan cepas EHEC mayormente positivas el gen *stx1* (Cid *et al.*, 2010; Luna *et al.*, 2012), en alpacas sin diarrea han logrado identificar principalmente el gen *stx2* (Silvera *et al.*, 2012; Mori *et al.*, 2014) siendo este capaz de producir un cuadro clínico más severo en el ser humano comparado con cepas positivas a *stx1* y en combinación (Pickering *et al.*, 1994). Además, la presencia de esta cepa sugiere la alpaca podría ser reservorio semejante a los roles desempeñados por el bovino, ovino, porcino y otras especies (OIE, 2004).

Este riesgo es relevante pues el manejo de alpacas en el mundo andino implica un estrecho contacto de los pastores y su familia con las crías, especialmente con las más débiles y las que se encuentran enfermas (Rosadio *et al.*, 2012).

Por ello el presente estudio tuvo como objetivo detectar cepas patógenas de *Escherichia coli* en alpacas neonatas y niños pastores dedicados a su crianza.

2.11. IDENTIFICACIÓN POR PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método enzimático de síntesis in vitro de largas cantidades de una región diana de ADN (Brown, 2000). Este proceso de amplificación requiere de cantidades mínimas de ADN. La técnica fue desarrollada por Kary B. Mullis, y descrita por primera vez en 1985, siendo esta una manera más simple de sintetizar grandes cantidades de ADN in vitro, basándose en el procedimiento que emplea la célula in vivo (Erich y Arnheim, 1992).

2.12. ETAPAS DE LA PCR

Las etapas de la PCR se llevan a cabo, una tras otra, en episodios cíclicos. Cada ciclo consiste de tres etapas:

2.12.1. DESNATURALIZACIÓN

Durante la desnaturalización (a temperatura de 95°C), las dobles cadenas del ADN se separan para formar cadenas sencillas. En la etapa inicial de desnaturalización, es esencial que se desnaturalice completamente el patrón de ADN. La desnaturalización incompleta del ADN dará como resultado el uso ineficiente del patrón en el primer ciclo de amplificación y en consecuencia, en un escaso rendimiento del producto de la PCR (Sambrook *et al*, 1989; Brown, 2000).

2.12.2. HIBRIDACIÓN

Durante la hibridación (a temperaturas que oscilan entre 45°C y 60°C), un iniciador se une a una cadena de ADN y otro se une a la cadena complementaria. Los sitios de hibridación de los iniciadores se han elegido para que fomente la síntesis del ADN en la región de interés durante la extensión. La temperatura de hibridación se calcula en 5°C por debajo de la temperatura de fusión del duplo iniciador-patrón de ADN. Si se obtiene producto de la PCR no

específicos, además del producto esperado, la temperatura de hibridación se puede optimizar aumentándola por incrementos de 1 a 2°C (Sambrook *et al*, 1989; Brown, 2000).

2.12.3. EXTENSIÓN

Durante la extensión (a temperatura cerca de 72°C) la síntesis del ADN se lleva a cabo en la región de interés y con distancias viables en la región flanqueante, produciendo fragmentos de longitudes variables. Esta síntesis es realizada por una ADN polimerasa termoestable, la Taq polimerasa, junto con un suministro de precursores de ADN (dexosinucleótidos trifosfatos: dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y la mezcla es calentada a una temperatura óptima para la síntesis de ADN, entre 70 a 75°C. Los oligonucleótidos alineados en el ADN molde, actúan ahora como iniciadores para la síntesis de nuevos polinucleótidos complementarios para las cadena molde de ADN (Sambrook *et al*, 1989).

Después del último ciclo, las muestras suelen incubarse a 72°C durante 5 min para completar los extremos que sobresalen de los productos de la PCR recién sintetizados (Sambrook *et al*, 1989).

Los ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión son repetidos de 20 a 30 veces, con un número de moléculas de ADN sintetizado que se dobla durante cada ciclo, esta exponencial amplificación resulta en la síntesis de un gran número de copias de la secuencia de ADN flanqueado por el par de iniciadores (Sambrook *et al*, 1989; Brown, 2000).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar del Estudio

Las muestras de animales y de los niños pastores provinieron de la localidad de Santa Rita, Ciudad Lircay, Provincia Angares del Departamentno de Huancavelica ubicada entre 3271 metros sobre el nivel del mar y tantos 12°59'03" latitud y 74°43'13" longitud y distante de 75 km de la ciudad de Huancavelica (Mi Perú, 2013). El procesamiento y análisis de las muestras se realizaron en las instalaciones de la Unidad de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.2. Toma y Procesamiento de muestras

3.2.1. Niños y Animales

Se recolectaron heces de un total de 72 crías de alpacas entre 2 a 7 semanas de edad y de 12 niños, hijos de pastores, que se encontraron presentes en el muestreo en el mes de febrero del año 2012. Los animales y los niños muestreados no presentaron signos diarreicos al momento del muestreo.

3.2.2. Recolección de muestras

Las muestras para el aislamiento de *Escherichia coli* consistieron de hisopados rectales de crías de alpacas y en el caso de los niños consistió en la entrega de un falcón de 50 ml. Todas las muestras sospechosas de contener cepas de *E. coli* en ambos casos fueron conservadas en glicerol a -80°C.

3.2.3. Reactivación, Aislamiento e Identificación de *Escherichia coli*

Las cepas congeladas fueron reactivadas en caldo Soya Tripticasa (MERCK) por 18 horas a 37°C en condiciones de aerobiosis, y posteriormente sembradas en Agar MacConkey (MERCK) e incubadas en las mismas condiciones. Posteriormente se seleccionaron las colonias que presentaron coloración rojiza (fermentación de lactosa) para su identificación bioquímica.

Para la identificación de *Escherichia coli* se utilizaron los siguientes criterios: i) Fermentación de lactosa, ii) Descarboxilación o desaminación de la lisina (Agar lisina hierro o LIA, MERCK), iii) Utilización de citrato (Agar Citrato de Simons MERCK), iv) Producción de indol (Medio SIM, MERCK), v) Actividad citocromo oxidasa (producción de la oxidasa, MERC), vi) Actividad catalasa, vii) Hidrolisis de la urea (Caldo urea MERCK).

Posteriormente las colonias identificadas como *E. coli* se inocularon en tubos conteniendo 1 ml de caldo LB (LB Broth Lennox ACUMEDIA) e incubado a condiciones aeróbicas a 37°C por 18 horas.

3.3. Genotipificación

3.3.1. Extracción de ADN bacteriano

La extracción de ADN bacteriano fue realizada por el método Fenol-Cloroformo, siguiendo el protocolo establecido en el laboratorio (Luna *et al.*, 2012). El cual, las colonias se diluyeron en 500 ul de Buffer STE 1X (0.01M Tris HCL pH 8, 0.015M NaCl y 0.001 EDTA pH 8), manteniéndose condiciones estériles e incubadas a 4°C por 12 horas, para luego homogenizarse y centrifugarse a 1400 g por 5 minutos para eliminar el sobrenadante. El precipitado obtenido fue resuspendido en 500 ul de STE 1X, y después de agregarse 35ul de SDS al 20% y 500 ul de fenol:cloroformo, se homogenizo y centrifugó a 1400 g para extraer el sobrenadante. Este último procedimiento fue repetido nuevamente para proceder a extraer el sobrenadante agregando cloroformo v/v. El ADN fue precipitado usando isopropanol y etanol al 30% (grado de biología molecular), y diluido con buffer TE. El ADN extraído se conservó a -20°C hasta su posterior utilización.

La concentración del ADN fue determinado mediante comparación de intensidad de fluorescencia con el ADN de Fago Lambda digerido con la enzima de restricción Hind III (λ

DNA/Hind III Markers, PROMEGA) en un gel de agarosa al 0.8% (Seakem LE Agarose, CAMBREX) (Imagen 1).

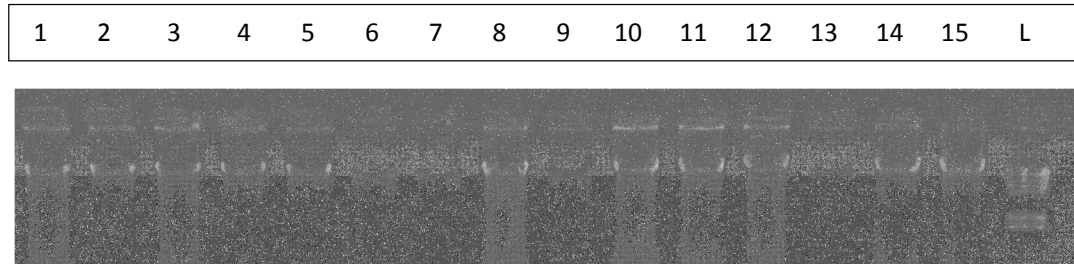


Figura1. Calidad de ADN de *E. coli* de muestras de heces de Alpacas; 1-15: Muestras de ADN de *E. coli* de Alpacas; L: ADN de *Fago lambda* (λ)

3.3.2. PCR múltiple

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa múltiple (PCR múltiple) fue realizada empleando los primers diseñados por Pass *et al* (2000) para detectar los genes *eae*, *stx1*, *stx2*, *sta*, *stb* y *lt* de los patotipos EPEC, EHEC y ETEC (Cuadro 1). Las cepas EPEC fueron, posteriormente, analizadas usando los primers diseñados por Gunzburg *et al* (1995) para el gen Bundle-forming pili (*bfp*) y las EHEC para la detección del serotipo O157:H7, los primers diseñados por Wang *et al* (2002) para los genes *rfbO157* y *flicH7* (Cuadro 1).

Cuadro1. Cebadores empleados en la PCR múltiple

Primer	Secuencia	Tamaño
Eae	(F) TGA GCG GCT GGC ATG AGT CAT AC (R) TCG ATC CCC ATC GTC ACC AGA GG	241 bp
Stx1	(F) ACG TTA CAG CGT GTT GCR GGG ATC (R)TTG CCA CAG ACT GCG TCA GTR AGG	121 bp
Stx2	(F) TGT GGC TGG GTT CGT TAA TAC GGC (R) TCC GTT GTC ATG GAA ACC GTT GTC	102 bp
Stb	(F) CCC CCT CTC TTT TGC ACT TCT TTC C (R)TGC TCC AGC AGT ACC ATC TCT AAC CC	423 bp
Lt1	(F) TGG ATT CAT CAT GCA CCA CAA GG (R) CCA TTT CTC TTT TGC CTG CCA TC	360 bp
Sta	(F) TTT CCC CTC TTT TAG TCA GTC AAC TG (R) GGC AGG ATT ACA ACA AAG TTC ACA G	160 bp
Bfp	(F) AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC (R) GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTC	326bp
rfbO157	(F) CTA CAG GTG AAG GTG GAA TGG (R) ATT CCT CTC TTT CCT CTG CGG	328 bp
flicH7	(F) TAC CAT CGC AAA AGC AAC TCC (R) GTC GGC AAC GTT AGT GAT ACC	247 bp

Fuente: Pass *et al* (2000), Gunzburg *et al* (1995) y Wang *et al* (2002)

La mezcla de la reacción de PCR fue desarrollada siguiendo el protocolo establecido por Pass *et al.* (2000), con algunas modificaciones. La mezcla de la reacción utilizó 1.0 pmol de cada cebador forward y reverse para la detección del gen *stx1*, 1.0 pmol de *stx2*, 0.5pmol de *sta*, 1.0 pmol de *stb*, 0.5 pmol de *lt*, 0.5 pmol *eae*, 100mM de KCL, 20 mM de Tris-HCL (pH: 8.3), 3mM de MgCl₂, 0.5mM de cada dNTPs, 2.5 U *Taq Polimerasa* y 1 ul de ADN bacteriano (25-30ng) en un volumen final de 20 ul. Las condiciones de PCR fueron de 95°C por 5 minutos seguidos de 30 ciclos (95C por 30 segundos, 63C por 30 segundos y 72C por 30) con una extensión final de 72C por 5 minutos.

Las cepas positivas solo al gen *eae*, fueron seleccionadas para realizar otro protocolo de PCR para detectar el gen *bfp*, codificadores del Bundle-forming Pili, utilizando los cebadores diseñados por Gunzburg *et al.* (1995). Esta prueba utilizó una mezcla consistente de 0.5µM de

cada cebador, 1.5 µl de buffer PCR 10X, 1.5 mM de MgCl₂, 100 µM de cada dNTP, 1 U de *Taq* polimerasa y 1 µl de ADN bacteriano en temperaturas desnaturalizantes iniciales de 94 °C por 5 min, 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 60 °C por 1 min y 72 °C por 1 min, y una extensión final de 72 °C por 5 min.

Las cepas positivas al gen *stx1* y/o *stx2*, fueron analizadas para la detección del serotipo O157:H7 mediante los genes *flicH7* y *rfbO157*, siguiendo el protocolo de Wang *et al.* (2002) con algunas modificaciones. El ensayo de PCR fue realizado con 10x Buffer PCR, 2mM de MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 2U taq DNA Polimerasa y 1 ul de ADN bacteriano con un volumen final de 20ul. Las condiciones para la amplificación de los genes fueron: 95°C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, con una extensión final de 72°C por 7 minutos. La amplificación de todas las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador modelo 2720 *Thermal Cycler* (Applied Biosystems, EEUU).

Los productos de PCR fueron separados por la técnica de electroforesis usando una cámara tipo horizontal, en un gel de agarosa (SeaKem LE Agarose, CAMBREX) al 2.5% diluido en buffer TBE 0.5X (Tris Base 0.0445M, Ac. Borico 0.0445M y EDTA 0.001M pH 8) a 100 V por 2 horas. Para la observación de las bandas de ADN amplificadas, el gel fue teñido por inmersión en una solución de bromuro de etidio (0-5ug/ml) por 2 min y visualizado en un transiluminador UV. Para la estimación del tamaño de los amplicones se utilizó un marcador de peso molecular (100 bp DNA ladder, PROMEGA).

3.3.3. Determinación de los patotipos de *Escherichia coli*

La determinación de los patotipos fue realizada de acuerdo a la clasificación establecida por Nataro y Kaper (1998) y basada en la presencia de los genes *stx1*, *stx2*, *eae*, *sta*, *stb*, y *lt*. (Cuadro 2).

Cuadro 2. Patotipos de *Escherichia coli* según los cebadores.

Gen	Enterotoxigenica ETEC	Enterohemorrágica EHEC	Enteropatogénica EPEC
Stx1	-	+/-	-
Stx2	-	+/-	-
Eae	-	+/-	+
Sta	+/-	-	-
Stb	+/-	-	-
Lt	+/-	-	-

Fuente: Nataro y Kaper (1998 ; (+): Presencia del gen; (-): Ausencia del gen

Las cepas EPEC fueron clasificadas en típicas y atípicas determinadas por la presencia o ausencia del gen *bfp* respectivamente. Por otro lado, las cepas EHEC que amplificaban al gen *rfbO157*, fueron consideradas positivas al antígeno somático O157, al igual en aquellas positivas al gen *flicH7* como poseedoras del antígeno flagelar H7.

IV. RESULTADOS

El análisis de las muestras obtenidas de los animales y de los niños en las siete familias dedicadas a la crianza de alpacas ubicadas en la localidad de Santa Rita del departamento de Huancavelica se encuentran detallados en la tabla 1. De los 72 animales muestreados se obtuvieron 288 cepas sospechosas de *E. coli* y de los 12 niños se logró aislar un total de 48 cepas.

Al análisis de las 72 alpacas neonatas muestreadas, 40 animales presentaron al menos un patotipo de *Escherichia coli* (Cuadro 3). En 33 de estos 40 animales se aislaron cepas EPEC clasificadas como típicas (n=6), atípicas (n= 18) y en 9 animales restantes se recuperaron ambos tipos de cepas típicas y atípicas (Cuadro 3, Figura 2 y 3). De 7/40 animales se aislaron cepas EHEC, 4 de estos 7 animales fueron cepas EHEC y de los restantes 3 se aislaron combinaciones de cepas EHEC y EPEC típicas y atípicas (Cuadro 3, Figura 2 y 3).

Cuadro 3. Relación de Patotipos de *E. coli* aislados por alpaca

Patotipos de <i>E. coli</i>		Número de Animales	Porcentaje (%)
EPEC	EPEC atípico	18	25%
	EPEC típico	6	8.3%
	EPEC típico y atípico	9	12.5%
EHEC	EHEC	4	5.6%
	EHEC y EPEC atípica	2	2.8%
	EHEC y EPEC típico	1	1.4%
TOTAL	TOTAL	40/72	55.6%

Al analizar el total de las cepas aisladas, las EPEC atípicas fueron las mas frecuentes (59.5%), seguidas de las típicas (30.9%) y en menor frecuencia las EHEC (13.2%) (Cuadro 4). Ocho de las las 9 cepas EHEC fueron positivas para el gen *stx2*, y solo una cepa fue positiva al gen *stx1* (Cuadro 4). En 6/9 EHEC tenían además el gen *eae*, pero en ninguna de estas cepas EHEC se le detectaron genes *rfbO157* y *flicH7*, correspondiente al serotipo O157:H7.

Cuadro 4. Aislados de cepas patógenas de *E. coli*

Patotipos de <i>E. coli</i>	Número de cepas	Porcentaje (%)
EPEC atípico	38	55.9%
EPEC típico	21	30.9%
EHEC	9	13.2%
TOTAL	68	100%

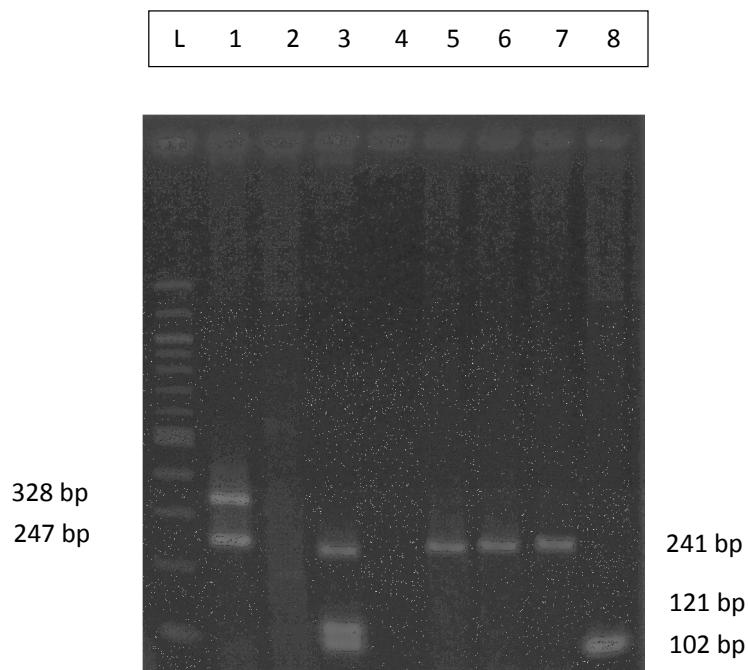


Figura 2. PCR múltiple de las cepas *E. coli* aisladas de alpacas y niño

L: Marcador 100 bp; 1: Cepa control positiva a los genes *rfbO157* y *flicH7*; 3: Cepa control positiva a los genes *eae*, *stx1*, *stx2*; 5, 6, 8: cepas positivas al gen *eae* y *stx2* de alpaca y 7: cepa positiva al gen *eae* de niño.

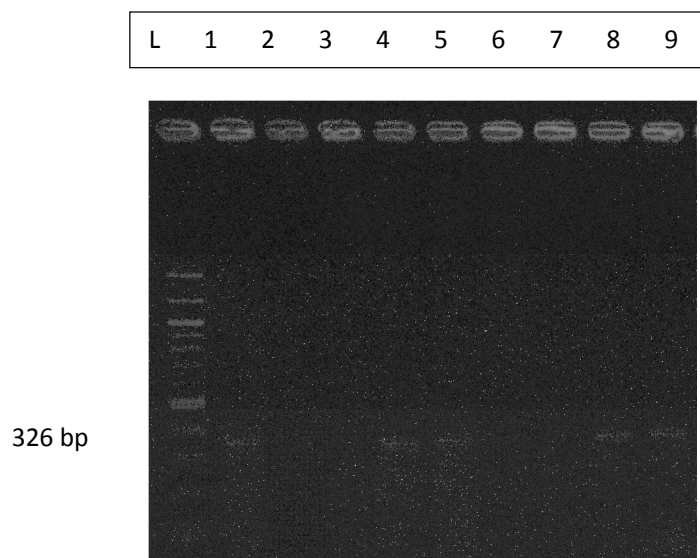


Figura 3. Clasificación de las cepas EPEC por PCR multiple aisladas de alpacas y niños

L: Marcador de 100 bp; 1,4,5: cepas positivas al gen *bfp* de alpaca, 8,9: cepas positivas al gen *bfp* de niño

Al relacionar asilamiento con edad de las alpacas muestreadas se detectaron que ambos tipos de EPEC fueron aislados a partir de la segunda semana hasta la séptima semana de edad, a diferencia de las cepas EHEC que se detectan a partir de la tercera semana de edad. Ambos patotipos de cepas EPEC y EHEC fueron reportadas en mayor cantidad en la tercera semana de edad.

Cuadro 5. Relación de cepas patógenas de *E. coli* de acuerdo a la edad del animal

Edad del Animal	EPEC			EHEC	Total de cepas	N° de Animales Positivos	Total de Animales
	Total	(<i>bfp</i> +)	(<i>bfp</i> -)				
2 semanas	2	1	1	0	2	2	2
3 semanas	13	3	10	4	17	9	16
4 semanas	9	4	5	2	11	7	17
5 semanas	10	3	7	1	11	7	13
6 semanas	10	2	8	2	12	6	9
7 semanas	4	3	1	0	4	3	4
ND	11	5	6	0	11	6	11
Total	59	21	38	9	68	40	72

ND: No determinado

En 4 de los 12 niños procedentes de 7 familias estudiadas se encontraron patotipos de *E. coli* (Cuadro 6) y de 8 de las 48 cepas fueron patógenas. Seis de estas 8 cepas contenían genes *eae* correspondientes a cepas EPEC (4 típicas y 2 atípicas), una EHEC y la otra restante ETEC (Cuadro 7). La cepa EHEC fue positiva al gen *stx1* y adicionalmente al gen *eae*, y la cepa ETEC amplificó la toxina termolábil (*lt*).

Cuadro 6. Relación de niños positivos a algún patotipo de *E. coli*

Patotipo de <i>E. coli</i>	Número de niños	Porcentaje (%)
EPEC atípica	1	8.33%
EPEC típica	2	16.67%
EHEC, ETEC	1	8.33%
TOTAL	4/12	33.33%

Cuadro 7. Relación de cepas aisladas de niños

Patotipos de <i>E. coli</i>	Número de cepas
EPEC típica	4
EPEC atípica	2
EHEC	1
ETEC	1
TOTAL	8/48

V. DISCUSIÓN

La diarrea neonatal infecciosa en alpacas es una de las patologías más frecuentes durante la época de parición. Investigaciones iniciales mencionan al *Clostridium perfringes* responsable de la enterotoxemia, como causa principal de la diarrea (Ameghino y DeMartini *et al.*, 1991, Perez *et al.*, 2012; Rosadio *et al.*; 2012) sin embargo diversos estudios sugieren que este proceso es producto de interacciones patogénicas, entre ellos la interacción de eimerias y *Clostridium perfringes* (Rosadio *et al.*, 2010) y se sospecha de la participación de distintos patotipos de *Escherichia coli* que han sido aislados a partir de diarreas clínicas y contenidos intestinales de fatalidades neonatales indicando la presencia de cepas EPEC y EHEC (Luna *et al.*, 2012; Cid *et al.*, 2010). Con el fin de conocer más sobre el rol de la *E. coli* en los procesos diarreicos, se han realizados diversos estudios en animales con y sin signos diarreicos, detectándose cepas patógenas aún de animales aparentemente normales y sin signos clínicos. (Silvera *et al.*, 2012; Mori *et al.*, 2014). Los distintos patotipos reportados en alpacas, son potencialmente patógenos para el hombre, donde *E. coli* es responsable del 30% de los casos de diarrea infantil (O'Ryan *et al.*, 2005), pudiendo producir infecciones fatales usualmente en personas inmunológicamente comprometidas pero sobre todo en niños (Medina *et al.*, 2010).

Las infecciones bacterianas en humanos ocurren por consumo de productos cárnicos contaminados y posiblemente por contacto directo con animales portadores de serotipos patogénicos (CDC, 2005).

Los resultados del presente estudio demuestra que las alpacas y los niños de pastores son portadores de cepas potencialmente patógenas de *E. coli*. Los análisis de los hisopados rectales de alpacas neonatas sin signos de diarrea, demuestran que más del 50% de estos animales muestreados tenían al menos un patotipo de *E. coli* probablemente patogénica para ambos tipos de hospederos. En alpacas, las cepas EPEC fueron aisladas con mayor frecuencia, concordante con el estudio realizado por Silvera *et al* (2012), evidenciando que estos animales son portadoras de cepas EPEC de significado riesgo pecuario y sanitario pues este patotipo es la principal causa de diarrea infantil en poblaciones humanas de bajos niveles socioeconómico (Gomes *et al.*, 1996). El riesgo patogénico se acentúa pues la mayoría de las cepas fueron EPEC atípicas, reportadas como factor de riesgo para la presentación de la diarrea infantil en Brasil, México y en el Perú (Araujo *et al*; 2007; Moreno *et al*; 2008; Estrada-García *et al.*, 2009)

A pesar de la baja frecuencia (9 de 38 genotipos) de cepas EHEC en las muestras de alpacas (Cuadro 4). Interesantemente, las cepas EHEC fueron principalmente positivas al gen *stx2* identificadas ser productoras de cuadros clínicos severos en humanos frente a las cepas que poseen solo el gen *stx1* o ambos (Pickering *et al.*, 2004). Además, la mayoría de las cepas EHEC recuperadas, tenían el gen *eae* responsable de la lesión de adhesión y borrado (Kaper *et al*, 2004) y de acción patológica, tal vez necesaria para una mayor agresividad patológica demostrada en la mayoría de brotes ocasionadas por el serotipo O157 (Werber *et al.*, 2003). La potencial patogenicidad de estas cepas EHEC aisladas se refuerzan pues 7 de estos aislados fueron citotóxicas para células VERO (datos por publicarse) de manera similar a los hallazgos por Luna *et al* (2012). Sin embargo debe indicarse que estas cepas han sido recuperadas de animales sin signos diarreicos, indicando que tal vez en estos no tenían expuestos los receptores celulares para iniciar la infección (Sandvig y Van Deurs, 2002) u otro factor no determinado en el presente estudio. La no asociación de cepas EHEC con procesos diarreicos, puede ser

interpretada, que la alpaca, de manera similar al bovino, sea portador sano en un estado de adultez (Mori *et al.*, 2014; Silvera *et al.*, 2012; Duncanson, 2013). Todas estas 7 cepas EHEC productoras de verocitotoxicidad fueron negativas a serotipo O157:H7, productores del síndrome urémico hemolítico (SUH) y la colitis hemorrágica (CH) en humanos. La no detección del serotipo O157:H7 coincide con los reportes de Silvera *et al* (2012) sin embargo el estudio realizado por Cordero *et al* (2009) detectan este serotipo en nuestro país así como lo reportado en camélidos sudamericanos de Reino Unido (VLA, 2009; Duncanson, 2013).

A pesar de haberse realizado serotipificación de nuestros aislados, se debe indicar que cepas entero patogénicas aisladas de alpacas con signos diarreicos corresponden a los serotipos de O78, O8 de cepas ETEC (Ramírez *et al.*, 1985); O8:H49, O21:H19, O117:H19 de cepas EHEC (Guzmán, datos por publicarse). Mientras que las cepas EHEC aisladas de animales aparentemente normales correspondieron a los serotipos: O21:H?, O26:H6, O117:H?, O118:H21, O128:H2, O146:H-, O146:H21, O157:H7, ONT (Cordero *et al.*, 2009) y H7 en el estudio realizado por Mori *et al* (2014). Los distintos serotipos reportados en alpacas, se han visto implicados como causantes de signos diarreicos en humanos (Crossman *et al*, 2010; Cho *et al*, 2010; Blanco *et al*, 2004; Mora *et al*, 2011; Eklund *et al.*, 2001).

En las muestras fecales no diarreicas de niños se lograron aislar solamente en 4/12 individuos y se lograron detectar de los 48 aislados solamente 8 fueron potencialmente patogénicas. La baja frecuencia de aislamientos tal vez refleje la poca cantidad de niños analizados. Sin embargo, entre estas cepas se detectaron a los 3 patotipos: EHEC, EPEC y ETEC concordantes con estudios previos realizados en nuestro país (Ochoa *et al.*, 2011; Ochoa *et al.*, 2009). Debe mencionarse que de un niño de ocho años de edad, se aislaron dos patotipos, una EHEC positiva a los genes *stx1* y *eae* y una segunda genotipada como ETEC- *lt*. Mientras que las cepas recuperadas de los animales en esta familia fueron del genotipo EPEC. En los 3 niños restantes se detectaron cepas EPEC típicas y atípicas. Se debe indicar que se desconoce si estos niños padecieron de signos clínicos antes de muestreo, pues estas cepas son productores de procesos entéricos y generalmente se hacen portadores después de la infección (Ademokya *et*

al., 2015). Todas las cepas positivas fueron aisladas de niños de edades 8-13 años, indicando que estos individuos tal vez sean portadores pues la mayoría de estas cepas causan diarreas en niños menores de cinco años (O’Ryan *et al.*, 2005). Además la cepa EHEC del niño fue negativo al gen *stx2* (Pickering *et al.*, 1994), sin embargo la cepa ETEC positiva al gen *lt*, causante de secreción excesiva de electrolitos y agua conduciendo a la deshidratación, acidosis metabólica, y posiblemente la muerte (Nataro y Kaper, 1998), podría deberse a que el gen de virulencia no estaba activo (Mojica *et al.*, 2003).

Las comunidades andinas dedicadas a la crianza de camélidos sudamericanos generalmente viven en extrema pobreza (Ameghino, 1991). Las familias analizadas, no tenían fuentes de agua potable, usaban agua del río y tampoco disponían de letrinas. Debe mencionarse que estudios previos reportan la presencia de ciertos patotipos de *E. coli* en los ríos (Johnson *et al.*, 2003; Gannon *et al.*, 2004), principalmente los que se encuentran cercanos a algún centro de producción pecuaria, ya que el bovino es el principal reservorio de cepas EHEC, no siendo afectado por este patógeno, pudiendo excretarlo y contaminar las aguas (Caprioli *et al.*, 2005). Al igual que en el caso de humanos portadores, siguen eliminando bacterias sin padecer signos clínicos (Stephan *et al.*, 2000), y la ausencia de letrinas es causa de que las personas realizan sus deposiciones en el campo, pudiendo transmitirlo a los animales (Sinnecker, 1976). Los niños positivos a algún patotipo de *E. coli*, quizás su fuente de agua estaba contaminada con cepas procedentes de alguna otra especie, como el bovino, ovino, etc. (Caprioli *et al.*, 2005), o tal vez por el constante contacto con las alpacas, sobre todo con los animales enfermos, estuvieron expuestos a contraer infecciones por *E. coli* (Rosadio *et al.*, 2012). Por consiguiente, se necesita más estudios en las familias dedicadas a la producción pecuaria, donde generalmente son los niños encargados del cuidado de los animales, y mediante otras pruebas comprobar el origen de las cepas en los niños positivos.

VI. CONCLUSIONES

De las muestras fecales de alpacas neonatas no diarreicas se aíslan patotipos de *Escherichia coli*, indicando la posibilidad que estos animales sean reservorios de este patógeno.

Los genotipos EHEC en estos aislados presentan mayormente el gen de la toxina stx2 conocida ser causante de diarreas severas en humanos.

De las heces de niños muestreados, igualmente se recuperaron cepas de *E. coli* patógenas y en mayor frecuencia, similarmente a las alpacas, del patotipo EPEC.

VII. RECOMENDACIONES

Determinar la fuente de infección en animales y/o niños para explicar el origen de los patotipos de *E. coli* circulando en ambos hospederos.

Realizar estudios filogenéticos de las cepas aisladas tanto de los niños y de los animales para determinar la posible zoonosis

Diseñar estudios que involucren el análisis de las fuentes de agua de familias dedicadas a la crianza de alpacas, ya que posiblemente cepas patógenas de *E. coli* estén presentes debido a la contaminación por otros hospederos.

Analizar los seis patotipos de *E. coli* en muestras de heces de alpacas, ya que diversos estudios en niños reportan su presencia, sobre todo en muestras diarreicas.

VIII. LITERATURA CITADA

- **Ackman D, Marks S, Mack P, Caldwell M, Root T, Birkhead G. 1997.** Swimming-associated haemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7 infection: evidence of prolonged contamination of a fresh water lake. *Epidemiol. Infect.* 119, 1–8.
- **Ademokya AA, Adebolu TT, Oladunmoye MK. 2015.** Carrier rate of *Escherichia coli* O157:H7 among apparently healthy people in ondo state and its antibiogram. *Int J Med Invest* 2015; vol 4; num 3;293-298
- **Afset JE, Bergh K, Bevanger L. 2003.** High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhoea. *J Med Microbiol*; 52:1015–9.
- **Albert MJ, Faruque AS, Faruque SM, Sack RB, Mahalanabis D. 1999.** Case-control study of enteropathogens associated with childhood diarrhea in Dhaka, Bangladesh. *J Clin Microbiol*; 37:3458–64.
- **Al-Majali, AM, Ababneh MM, Shorman M, Saeed AM. 2007.** Interaction of *Escherichia coli* heat - stable enterotoxin (STa) with its putative receptor on the intestinal tract of newborn kids. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 49: 35 – 40.
- **Ameghino E. 1991.** Causas de mortalidad en crías de alpacas. En: Fernández-Baca S (ed). *Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos*. Santiago de Chile: FAO, p 149-200.

- **Ameghino E, DeMartini J. 1991.** Mortalidad de crías de alpacas. Bol Div IVITA, Lima, p 71-80.
- **Anon, 2000.** Waterborne outbreak of gastroenteritis associated with a contaminated municipal water supply. Walkerton, Ontario. May–June 2000. Canada Communicable Disease Report. 26: 170–173.
- **Arainga MA, Taguchi T, Morales SM, Portilla KV, Villacaqui ER, Valencia N, Rivera H, Yamasaky S. 2008.** Detección de genes de *E. coli* enterohemorrágica productora de toxina *Stx1* y *Stx2* en alpacas (*Lama pacos*) con diarrea. En: XIX Congreso Nacional de Ciencias Verinarias. Perú.
- **Araujo JM, Tabarelli GF, Aranda KR, Fabbicotti SH, Fagundes-Neto U, Mendes CM, Scaletsky IC. 2007.** Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. J Clin Microbiol; 45:3396–9
- **Artz, R.R., Killham, K., 2002.** Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in private drinking water wells: influences of protozoan grazing and elevated copper concentrations. FEMS Microbiol Lett. 216 (1), 117–122.
- **Arias BI, Caceres RO, Figueroa VM, Huguet TJ, Camiña QM. 2004.** *Escherichia coli* Enteroagregativa en niños con diarrea de un hospital de Lima. Rev Peru Med Exp Salud Pública 21(3).
- **Berberov EM, Zhou Y, Francis DH, Scott MA, Kachman SD, Moxley RA. 2004.** Relative importance of heat - labile enterotoxin in the causation of severe diarrheal disease in the gnotobiotic piglet model by a strain of enterotoxigenic *Escherichia coli* that produces multiple enterotoxins. Infect Immun. 72: 3914 – 3924.
- **Beausoleil HE, Labrie V, and Dubreuil JD. 1999.** Is *Escherichia coli* STb enterotoxin sufficient to cause pig diarrhea? Vet. Microbiol. 70: 281 – 285.
- **Beutin L, Marchés O, Bettelheim KA, Gleier K, Zimmermann S, Schmidt H, Oswald E (2003).** Hep-2 cell adherence, actin aggregation, and intimin types of attaching and

effacing *Escherichia coli* strains isolated from healthy infants in Germany and Australia. *Infect Immun* 71:3995-4002.

- **Blanco M, Blanco EJ, Dahbi G, Alonso PM, Mora A, Coira AM, Madrid C, Juarez A, Bernardez IA, Gonzales AE, Blanco J. 2006.** Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Intern. Microbiology* 9 :103-110.
- **Bravo de Rueda C. 2006.** Caracterización molecular de los genes *stx1*, *stx2* y *eae* en aislados de *Escherichia coli* de crías de alpacas con diarrea. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Lima: Univ Peruana Cayetano Heredia. 73 p.
- **Bray J. 1945.** Isolation of antigenically homogenous strains of *Bact. Coli neapolitanum* from summer diarrhoea in infants. *J Pathol Bacteriol* 57, 239–247.
- **Brigotti M, Carnicelli D, Ravanelli E, Vara AG, Martinelli C, Alfieri RR, Petronini OG, Sestili P. 2007.** Molecular damage and induction of proinflammatory cytokines in human endothelial cells exposed to Shiga toxin 1, Shiga toxin 2, and alpha - sarcin. *Infect. Immun.* 75: 2201 – 2207.
- **Brown T. 2000.** The polymerase chain reaction. En: *Essential molecular biology. A practical approach*. Vol. 2. 2da ed. p 89-120. Oxford University Press. Oxford.
- **Brüssow H, Rahim H, Freire W. 1992.** Epidemiological analysis of serologically determined rotavirus and enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in Ecuadorian children. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1585–1587.
- **Bueris V, Sircili MP, Taddei CR, Fernandes M, Regina FM, Baquerizo MM, Ramos FS, Lima BM, Rachid TL. 2007.** Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 102:839–44
- **Bustanza V. 2001.** La alpaca: conocimiento del gran potencial andino. Puno, Perú: Univ Nac del Altiplano. 496 p.
- **Cama RI, Parashar UD, Taylor DN, Hickey T, Figueroa D, Ortega YR, Romero S, Perez J, Sterling CR, Gentsch JR, Gilman RH, Glass RI. 1999.** Enteropathogens and

other factors associated with severe disease in children with acute watery diarrhea in Lima, Peru. *J Infect Dis*; 179:1139–44.

- **Caprioli A, Morabito S, Brugere H, Oswald E. 2005.** Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res*; 36:289-311.
- **Castellani A, Chalmers AJ. 1919.** Manual of tropical medicine. Williams, Wood and Co., New York.
- **Castro-Rodríguez JA, Salazar-Lindo E, León-Barúa R. 1997.** Differentiation of osmotic and secretory diarrhea by stool carbohydrate and osmolar gap measurements. *Arch Dis Child. Sep* ;77(3) :201-5.
- **Cid D, Martin-Espada C, Maturrano L, García A, Luna L, Rosadio R. 2010.** Diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from neonatal Peruvian alpacas (*Vicugna pacos*) with diarrhea. V Simposio Europeo sobre Camélidos y otras Fibras. Sevilla, España.
- **[CDC] Centers of Disease Control and Prevention. 2005.** Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 Associated with Petting Zoos-North Carolina, Florida, and Arizona, 2004 and 2005. 54(50);1277-1280
- **Choi C, Cho W, Chung H, Jung T, Kim J, Chae C. 2001.** *Escherichia coli* heat - stable enterotoxin 1 (EAST1) gene in isolates in weaned pigs with diarrhea and/or edema disease. *Vet. Microbiol.* 81: 65 – 71.
- **Chalmers RM, Aird H, Bolton FJ. 2000.** Waterborne *Escherichia coli* O157. *J. Appl. Microbiol. Symp.* 88, 124S–132S.
- **Contreras CA, Ochoa TJ, Ruiz J, Lacher DW, Rivera FP, Saenz Y, Chea-Woo E, Zavaleta N, Gil AI, Lanata CF, Huicho L, Maves RC, Torres C, DebRoy C, Cleary TG. 2011.** Phylogenetic relationships of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from Peruvian children. *Journal of Medical Microbiology*, 60, 639-646.
- **Cordero A, Blanco M, Huanca W, Mora A, Herrera A, Puentes B, Quina E, López C, Mamani R, Blanco JE, Blanco J. 2009.** Determinación de serotipos y genes de

virulencia de *Escherichia coli* Verotoxigénicos (ECVT), en coprocultivos de alpacas (vicugna pacos) clínicamente sanas, procedentes de puna húmeda del Perú. Arch. Lat. Am. ALPA

- **Contreras G. 2010.** Asociacion de variabilidad genética y fenotípica de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) con cuadros de diarrea en niños menores de un año. Tesis de Magister en Biología Molecular. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 58-83 p.
- **Croxen MA, Finlay BB. 2010.** Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Nat. Rev. Microbiol. 8 (1), 26–38.
- **Daniels NA., Neimann J, Karpati A., Parashar DU, Greene DK, Wells GJ, Srivastava A, Tauxe VR, Mintz DE, Quick R. 2000.** Traveler's diarrhea at sea: three outbreaks of waterborne enterotoxigenic *Escherichia coli* on cruise ships. J. Infect. Dis. 181, 1491–1495.
- **Dean P, Kenny B. 2009.** The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. Curr. Opin. Microbiol. 12: 101 – 109.
- **Dean - Nystrom EA, Bosworth BT, Cray WC, Moon HW. 1997.** Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves. Infect. Immun. 65: 1842 – 1848.
- **Dev, V.J., Main, M., Gould, I., 1991.** Waterborne outbreak of *Escherichia coli* O157. Lancet 337, 1412.
- **Devenish J, Gyles C, and LaMarre J. 1998.** Binding of *Escherichia coli* verotoxins to cell Surface protein on wild - type and globotriaosylceramide - deficient Vero cells. Can. J. Microbiol. 44: 28 – 34.
- **Dorn, CR, Francis DH, Angrick EJ, Willgohe JA, Wilson RA, Collins JE, Jenke BH, Shawd SJ. 1993.** Characteristics of Vero cytotoxin producing *Escherichia coli* associated with intestinal colonization and diarrhea in calves. Vet. Microbiol. 36: 149 – 59.

- **Donnenberg MS, Kaper JB, Finlay BB. 1997.** Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. Trends Microbiol. 5: 109 – 114.
- **Do TN, Cu PH, Nguyen HX, Au TX, Vu QN, Driesen SJ, Townsend KM, Chin JJ, Trott DJ. 2006a.** Pathotypes and serogroups of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pre - weaning pigs in north Vietnam. J. Med. Microbiol. 55: 93 – 99.
- **Do TN, Wilkie I, Driesen SJ, Fahy VA, Trott DJ. 2006b.** Pathogenicity of Vietnamese enterotoxigenic *Escherichia coli* strains in colostrum - deprived one - day - old piglets. Vet. Pathol. 43: 150 – 160.
- **Dorsey FC, Fischer JF, Fleckenstein JM. 2006.** Directed delivery of heat – labile enterotoxin by enterotoxigenic *Escherichia coli*. Cell. Microbiol. 8: 1516 – 1527.
- **Dubreuil JD. 1997.** *Escherichia coli* STb enterotoxin. Microbiology 143: 1783 – 1795.
- **Dubreuil JD. 2008.** *Escherichia coli* STb toxin and colibacillosis: knowing is half the battle. FEMS Microbiol. Lett. 278: 137 – 145.
- **Duncanson GR. 2013.** Farm Animal Medicine and Surgery: For Small Animal Veterinarians. Ed. CABI. Pp. 147
- **Eklund MF, Scheutz F, Siitonen AJ. 2001.** Clin. Microbiol. 39, 2829–2834.
- **Ellis R, Wilson R, Ramirez A. 1983.** Characteristics of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from neonatal alpaca. In: Proc IV International Symposium on Neonatal Diarrhea. Saskatoon, Canada.
- **Erlich HA, Arnheim N. 1992.** Genetic analysis using the polymerase chain reaction. Ann. Rev. Genet. 24 :479-506.
- **Erume J, Berberov EM, Kachman SD, Scott MA, Zhou Y, Francis DH, Moxley AR. 2008.** Comparison of the contributions of heat – labile enterotoxin and heat - stable enterotoxin b to the virulence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in F4ac receptor - positive young pigs. Infect. Immun. 76: 3141 – 3149.
- **Escherich T. 1885.** Die darmnakterien des neugeborenen und sauglings. Fortshr Med. 3:5-15-522, 547-554.

- **Escherich T. 1894.** Über Cystitis bei Kindern hervorgerufen durch das *Bacterium coli commune*. Vortrag 1984. Nr. 6. Mitt. D. Vereins D. Ärzte i.d. Steiermark.
- **Estrada-García T, Lopez-Saucedo C, Thompson-Bonilla R, Abonce M, Lopez-Hernandez, Ignacio SJ, Rosado JL, DuPont HL, Long KZ. 2009.** Association of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes with infection and diarrhea among Mexican children and association of atypical enteropathogenic *E. coli* with acute diarrhea. J Clin Microbiol; 47:93–8.
- **Fairbrother JM, Ngeleka M. 1994.** Extraintestinal *Escherichia coli* infections in pigs. In *Escherichia coli* in domestic animals and humans. C. L. Gyles (ed.). Wallingford, Oxon: CAB International, pp. 221 – 236.
- **Fairbrother JM, Broes A, Jacques M, Lariviere S. 1989.** Pathogenicity of *Escherichia coli* O115:K "V165 " strains isolated from pigs with diarrhea . Am. J. Vet. Res. 50: 1029 – 1036.
- **Fairbrother, JM, Batisson I, Girard F, Mellata M, Pérès S. 2002.** Original text on *E. coli*. animal health and production compendium. Wallingford, Oxfordshire: CAB International. CD – ROM.
- **Feachem RG, Bradley DJ, Garelick H, Mara DD. 1983.** Sanitation and disease: Health Aspects of excreta and wastewater management. John Wiley & Sons, Chichester.
- **Featherstone CA, Foster AP, Chappell SA, Carson T, Pritchard GC. 2011.** Verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in camelids. Veterinary Record, 168, 194–195.
- **Fernández Baca S. 2005.** Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo de la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina TCP/RLA/2914. Food and Agriculture Organisation (FAO).
- **Figuroa-Quintanilla D, Salazar-Lindo E, Sack RB, Leon-Barua R, Sarabia-Arce S, Campos-Sanchez M, Eyzaguirre-Maccan E. 1993.** A controlled trial of bismuth

subsalicylate in infants with acute watery diarrheal disease. *N Engl J Med* 328: 1653-1658.

- **Gannon VP, Graham TA., Read SI, Ziebell K, Muckle A, Mori J, Thomas J, Selinger B, Townshend I, Byrne J. 2004.** Bacterial pathogens in rural water supplies in Southern Alberta. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 67, 1643–1653.
- **Garrity G, Bell J, Lilburn T. 2004.** Taxonomic outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition. Bergey's Manual Trust.
- **Giannella RA, Mann EA. 2003.** *E. coli* heat - stable enterotoxin and guanylyl cyclase C: new functions and unsuspected actions. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 114: 67 – 85.
- **Gleeson C, Gray N. 1997.** The coliforms index and waterborne disease. E and FN Spon, London, 1997.
- **Gyles CL. 1994.** *Escherichia coli* enterotoxins. In *Escherichia coli* in domestic animals and humans. C. L. Gyles (ed.). Wellingford, Oxon: CAB International, pp. 337 – 364.
- **Gyles CL. 2007.** Shiga-toxin producing *Escherichia coli*: an overview. *J. Anim. Sci.* 85 (Suppl E), E45–E62.
- **Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. 2010.** Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 4^o Edition. USA: Office. p 267-285
- **Gonçalves C, Berthiaume F, Mourez M , and J. D. Dubreuil. 2008.** *Escherichia coli* STb toxin binding to sulfatide and its inhibition by carragenan. *FEMS Microbiol. Lett.* 281: 30 – 35.
- **Gomes TAT, Griffin PM, Ivey C, Trabulsi LR, Ramos SRTS 1996.** EPEC infections in São Paulo. *Rev Microbiol* 27: 25-33.
- **Goffaux F, China B, Janssen L, Pirson V, Mainil J. 1999.** The locus for enterocyte effacement (LEE) of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from dogs and cats. *Adv. Exp. Med. Biol.* 473: 129 – 136.

- **Giron JA, Ho AS, Schoolnik GK. 1993.** Characterization of fimbriae produced by enteropathogenic *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 175: 7391 – 7403.
- **Greenberg BL, Sack RB, Salazar-Lindo E, Budge E, Gutierrez M, Campos M, Visberg A, Leon-Barua R, Yia A, Maurutia D, et al. 1991.** Measles-associated diarrhea in Lima, Peru: pathogenic agents and impact on growth. J infect Dis. Mar; 163(3):495-502
- **Hancock DD, Besser TE, Rice DH. 1998.** Ecology of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle and impact of management practices. In: Kaper, J.B., O'Brien, A.D. (Eds.), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 85–91.
- **Harville BA, Dreyfus LA. 1995.** Involvement of 5 - hydroxytryptamine and prostaglandin E2 in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat - stable enterotoxin B. Infect. Immun. 63: 745 – 750.
- **Hadad JJ, Gyles CL. 1982.** The role of K antigens of enteropathogenic *Escherichia coli* in colonization of the small intestine of calves. Can. J. Comp. Med. 46: 21 – 26.
- **Heyderman RS, Soriani M, Hirst TR. 2001.** Is immune cell activation the missing link in the pathogenesis of post - diarrhoeal HUS? Trends Microbiol. 9: 262 – 266.
- **Hoey DE, Sharp L, Currie C, Lingwood CA, Gally DL, Smith DG. 2003.** Verotoxin 1 binding to intestinal crypt epithelial cells results in localization to lysosomes and abrogation of toxicity. Cell. Microbiol. 5: 85 – 97.
- **Huapaya B, Huguet J, Suárez V, Torres de Yón Y, Montoya Y, Salazar-Lindo E, Sakuray S, Tejada C, Gambirazio C, Gómez J. 2001.** Primer Aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 enterohemorrágica en el Perú. Rev Med Exp; 18(1-2)
- **Huerta M, Grotto I, Gdalevich M, Mimouni D, Gavrieli B, Yavzori M, Cohen D, Shpilberg O. 2000.** A waterborne outbreak of gastroenteritis in the Golan Heights due to enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infection 28, 267–271.

- **Huguet J, Huapaya B, Salazar E. 2002.** Determinación de factores de virulencia asociados a *Escherichia coli* enterohemorrágica en cepas peruanas aisladas entre 1999 – 2001. Rev. Peru Med. Exp. Salud Publica 19 (2): 63-67.
- **Hunter PR. 2003.** Drinking water and diarrhoeal disease due to *Escherichia coli*. J Water Health. 1 (2), 65–72.
- **Johnson B. 2003.** OSHA infectious dose. White Paper. Appl. Biosafety 8 (4), 160–165.
- **Johnson JYM., Thomas JE, Graham TA., Townshend I, Byrne J, Selinger LB, Gannon VP. 2003.** Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella spp.* in surface waters of southern Alberta and its relation to manure sources. Can. J. Microbiol. 49, 326–335.
- **Johnson AM, Kaushik RS, Francis DH, Fleckenstein JM, Hardwidge PR. 2009.** Heat - labile enterotoxin promotes *Escherichia coli* adherence to intestinal epithelial cells .J. Bacteriol. 191: 178 – 186.
- **Isaäcson M, Canter PH, Effler P, Arntzen L, Bomans P, Heenan R., 1993.** Haemorrhagic colitis epidemic in Africa. Lancet 341, 961.
- **Kaper JB, Elliott S, Sperandio V, Perna NT, Mayhew GF, Blattner FR. 1998.** Attaching - and - effacing intestinal histopathology and the locus of enterocyte effacement. In *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin - producing *E. coli* strains. Kaper JB and O'Brien AD (eds.). Washington, DC: American Society for Microbiology, pp. 163 – 182.
- **Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. 2004.** Pathogenic *Escherichia coli*. Nat. Rev. Microbiol. 2: 123 – 140.
- **Krause G, Zimmermann S, Beutin L. 2005.** Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin - (eae) gene positive *Escherichia coli* types. Vet. Microbiol. 106: 87 – 95.

- **Keller R, Ordonez JG, De Oliveira RR, Trabulsi LR, Baldwin TJ, Knutton S. 2002.** Afa, a diffuse adherence fibrillar adhesin associated with enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 70: 2681 – 2689.
- **Keene WE, McAnulty JM, Hoesly FC, Williams LP Jr, Hedberg K, Oxman GL, Barrett TJ, Pfaller MA, Fleming DW. 1994.** A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. N. Engl. J. Med. 331, 579–584.
- **Kerr M., Fitzgerald M, Sheridan JJ, McDowell DA, Blair IS. 1999.** Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in bottled natural mineral water. J. Appl. Microbiol. 87 (6), 833–841.
- **Kimmitt PT, Harwood CR, Barer MR. 2000.** Toxin gene expression by shiga toxin - producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. Emerg. Infect. Dis. 6: 458 – 465.
- **Konowalchuk J, Speirs JJ, Stavric S. 1977.** Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect. Immun 1977; 18: 775-779.
- **Lanata CF, Black RE, Maurtua D, Gil A, Gabilondo A, Yi A, Miranda E, Gilman HR, Leon-Barua R, Bradley SR. 1992.** Etiologic agents in acute vs. persistent diarrhea in children under 3 years of age in peri-urban Lima, Peru. Acta Paediatr Suppl;381:32-38
- **Lanata CF, Mendoza W, Black RE. 2002.** Improving diarrhoea estimates. World Health Organization. Instituto de Investigacion Nutricional, Lima, Perú.
- **Levine MM, Ferreccio C, Prado V, Cayazzo M, Abrego P, Martinez J, Maggi L, Baldini MM, Martin W, Maneval D. 1993.** Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrheal infections in a low socioeconomic level peri-urban community in Santiago, Chile. Am J Epidemiol; 138:849–69.

- **Levine MM. 1987.** *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. J. Infect. Dis. 155: 377 – 389.
- **Lingwood CA, Mylvaganam M, Arab S, Khine AA, Magnusson G, Grinstein S, Nyholm P-G. 1998.** Shiga toxin (Verotoxin) binding to its receptor glycolipid. In *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin - producing *E. coli* strains. Kaper JB, O'Brien AD (eds.). Washington, DC: American Society for Microbiology pp. 129 – 139.
- **Licence, K., Oates, K.R., Synge, B.A., Reid, T.M., 2001.** An outbreak of *E. coli* O157 infection.
- **Llanos A, Lee J, López F, Contreras C, Barletta F, Chea-Woo E, Ugarte C, Cleary TG, Ochoa TJ. 2012.** Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Peruvian children with bloody diarrhea. *Pediatr Infect Dis J*;31(3):314-316.
- **Lopez MD, Sagaró GE, Valdes DM, Fragoso AT, Aibizu-Compos J.1996.** Aislamiento de Agentes Enteropatógenos en la Diarrea persistente. *Rev Gastroenterología del Perú- Vol 16, N°3.*
- **Luna L, Maturrano L, Rivera H, Zanabria V, Rosadio R. 2012.** Genotipificación, evaluación toxigénica *in vitro* y sensibilidad a antibióticos de cepas de *Escherichia coli* aisladas de casos diarreicos y fatales en alpacas neonatas. *Rev Inv Vet, Perú* 23: 280-288.
- **Mainil JG, Gerardin J, Jacquemin E. 2000.** Identification of the F17 fimbrial subunit – and adhesion - encoding (f17A and f17G) gene variants in necrotoxigenic *Escherichia coli* from cattle, pigs and humans. *Vet. Microbiol.* 73: 327 – 335.
- **Medina AM, Rivera FP, Romero LM, Kolevic LA, Castillo ME, Verne E, Hernandez R, Mayor EY, Barletta F, Mercado E, Ochoa JT. 2010.** Diarrheagenic *Escherichia coli* in HIV pediatric patients in Lima, Perú. *Am J Trop Med Hyg*;83(1):158-63.
- **Ménard L. - P, Dubreuil JD. 2002.** Enteroaggregative *Escherichia coli* heat – stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. *Crit. Rev. Microbiol.* 28: 43 – 60.

- **Mercado EC, Rodríguez S, Elizondo A, Marcoppido G, Parreño V. 2004.** Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from a South American camelid (*Lama guanicoe*) with diarrhea. J Clin Microbiol 42: 4809-4811.
- **Milon A, Oswald E, De Rycke J. 1999.** Rabbit EPEC: a model for the study of enteropathogenic *Escherichia coli*. Vet. Res. 30: 203 – 219.
- **Mi Peru. 2013.** Ubicación Geografica de Lircay, Angaraes, Huancavelica. [Internet], [6 marzo 2013]. Disponible en: www.viasatelital.com/peru/?p=5623
- **Mojica T, Sanchez O, Bobadilla L. 2003.** La Proteómica, otra cara de la genómica. Nova – publicacion cientifica ISSN:1794-2370 vol.1 No. 1 Enero – Diciembre:1-116
- **Moxley RA, Francis DH. 1986.** Natural and experimental infection with an attaching and effacing strain of *Escherichia coli* in calves. Infect. Immun. 53: 339 – 346.
- **Mori L, Perales R, Rodriguez J, Shiva C, Koga Y, Choquehuanca G, Palacios C. 2014.** Molecular Identification of Shiga-Toxin Producing and Enteropathogenic *Escherichia coli* (STEC and EPEC) in Diarrheic and Healthy Young Alpacas. Adv Microbiology. 4. 360-364.
- **Nagy B, Fekete PZ. 1999.** Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. Vet. Res. 30: 259 – 284.
- **Nagy B, Fekete PZ. 2005.** Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. Int. J. Med. Microbiol. 295: 443 – 454.
- **Nataro JP, Kaper JB. 1998.** Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11: 142 – 201.
- **Naylor SW, Low JC, Besser TE, Mahajan A, Gunn GJ, Pearce MC, McKendrick IJ, Smith DG, Gally DL. 2003.** Lymphoid follicle - dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host. Infect. Immun. 71: 1505 – 1512.
- **Naylor SW, Gally DL, Low JC. 2005.** Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine Int. J. Med. Microbiol. 295: 419 – 441

- **Ochoa TJ, Barletta F, Contreras C, Mercado E. 2008.** New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 102:852–6.
- **Ochoa TJ, Ecker L, Barletta F, Mispireta ML, Gil IA, Contreras C, Molina M, Amemiya I, Verastegui H, Hall ER, Cleary TG, Lanata CF. 2009.** Age-Related Susceptibility to Infection with Diarrheagenic *Escherichia coli* among Infants from Periurban Areas in Lima, Peru. *C Inf Diseases*;49
- **Ochoa TJ, Mercado EH, Durand D, Fulton PR, Mosquito S, Contreras C, Riveros M, Lluque A, Barletta F, Prada A, Ruiz J. 2011.** Frecuencia y Patotipos de *Escherichia coli* Diarrogenica en niños peruanos con y sin diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*; 28(1); 13-20
- **[OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2004.** *Escherichia coli* verotoxigénica. Manual de la OIE sobre animals terrestres. Cap. 2.10.13. [Internet], [13 marzo 2009].

Disponible: www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.10.13_Escherichia_coli_verocio_toxigenica_ruth.pdf
- **O'Loughlin EV, Robins – Browne RM. 2001.** Effect of Shiga toxin and Shiga - like toxins on eukaryotic cells. *Microbes Infect.* 3: 493 – 507.
- **O'Ryan M, Prado V, Pickering LK. 2005.** A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. *Semin Pediatr Infect Dis*;16:125–36
- **O'Mahony M, Noah ND, Evan B, Harper D, Rowe B, Lowes AJ, Pearson A, Goode B., 1986.** An outbreak of gastroenteritis on a passenger cruise ship. *J. Hyg.* 97, 229–236.
- **Pabst WL, Altwegg M, Kind C, Mirjanic S, Hardegger D, Nadal D. 2003.** Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* among children with and without diarrhea in Switzerland. *J Clin Microbiol* 41: 2289-2293.

- **Pazzaglia G, Sack RB, Salazar E, Yi A, Chea E, Leon-Barua R, Guerrero CE, Palomino J. 1991.** High frequency of coinfecting enteropathogens in Aeromonas-associated diarrhea of hospitalized Peruvian infants. *J Clin Microbiol*;29:1151-6
- **Prado JV, Cavagnaro SMF; Grupo de Estudio de Infecciones por STEC. 2008.** Hemolytic uremic syndrome associated to shigatoxin producing *Escherichia coli* in Chilean children: clinical and epidemiological aspects. *Rev Chilena Infectol*; 25(6):435-444.
- **Palermo MS, Exeni RA, Fernández GC. 2009.** Hemolytic uremic syndrome: pathogenesis and update of interventions. *Expert Rev Anti Infect Ther*.;7(6):697-707
- **Perez JD, Maturrano HL, Rosadio AR. 2012.** Genotipificación y Subtipificación molecular de cepas de *Clostridium perfringens* aisladas en alpacas muertas por enterotoxemia. *Rev Inv Vet Peru Vol. 23 Issue 3*, p272-279. 8p
- **Philpott DJ, Ackerley CA, Kiliaan AJ, Karmali MA, Perdue MH, Sherman PM. 1997.** Translocation of verotoxin - 1 across T84 monolayers: mechanism of bacterial toxin penetration of epithelium. *Am. J. Physiol.* 273: G1349 – G1358.
- **Porat N, Levy A, Fraser D, Deckelbaum RJ, Dagan R. 1998.** Prevalence of intestinal infections caused by diarrheagenic *Escherichia coli* in Bedouin infants and young children in southern Israel. *Pediatr Infect Dis J*; 17:482–8.
- **Prager R, Strutz U, Fruth A, Tschäpe H. 2003.** Subtyping of pathogenic *Escherichia coli* strains using flagellar (H) - antigens: serotyping versus fliC polymorphisms. *Int. J. Med. Microbiol.* 292: 477 – 486.
- **Pebody RG, Furtado C, Rojas A, McCarthy N, Nylen G, Ruutu P, Leino T, Chalmers R, De Jong B, Donnelly M, Fisher I, Gilham C, Graverson L, Cheasty T, Willshaw G, Navarro M, Salmon R, Leinikki P, Wall P, Bartlett C. 1999.** An international outbreak of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infection amongst tourists; a challenge for the European infectious disease surveillance network. *Epidemiol. Infect.* 123, 217–223.

- **Percival LS, Yates VM, Williams D, Chalmers R, Gray Nocholas. 2014.** Microbiology of Waterborne Diseases. Second edition. Chapter six. pp: 89-106.
- **Pickering LK, Obrig TG, Stapleton FB. 1994.** Hemolytic-uremic syndrome and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Pediatr Infect Dis J* 13: 459-476.
- **Ramírez A. 1991.** Enfermedades infecciosas. En: Fernández-Baca S (ed). Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. Santiago de Chile: FAO. p 263-324.
- **Rivera FP, Ochoa TJ, Maves RC, Bernal M, Medina AM, Meza R, Barletta F, Mercado R, Ecker L, Gil IA, Hall RE, Huicho L, Lanata FC. 2010.** Genotypic and phenotypic characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains isolated from Peruvian children. *J Clin Microbiol*;48(9):3198-203
- **Robinson CM, Sinclair JF, Smith MJ, O'Brien AD. 2006.** Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* type O157:H7 promotes intestinal colonization. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A* 103: 9667 – 9672.
- **Rosadio AR, Maturrano HL, Perez JD, Luna EL. 2012.** El complejo entérico neonatal en alpacas andinas. *Rev Inv Vet Peru*; 23 (3):261-271.
- **Rosadio R, Londoño P, Perez D, Castillo H, Veliz A, Llanco L, Yaya K, Maturrano L. 2010.** *Eimeria macusaniensis* associated lesions in neonate alpacas dying from enterotoxemia. *Veterinary Parasitology* 168: 116-120.
- **Rosenberg ML, Koplan JP, Wachsmuth IK, Wells JG, Gangarosa EJ, Guerrant RL, Sack DA. 1977.** Epidemic diarrhea at Crater Lake from Enterotoxigenic *Escherichia coli*. A large waterborne outbreak. *Ann. Intern. Med.* 86, 714–718.
- **Sakihara-Asato G, Encimas M, Pimentel-Román EB, Reyna R, Valenzuela-Espejo NM, Margarita N. 2001.** Epidemiología del síndrome urémico hemolítico: experiencia en 21 años (1976 - 1996), Servicio de Nefrología del Instituto de Salud del Niño. *Rev. Peru. Pediatr* ;54(1):12-17.

- **Salazar-Lindo E, Salazar M, Alvarez JO. 1993.** Association of diarrhea and low serum retinol in Peruvian children. *Am J Clin Nutr*; 58:110-113.
- **Salazar-Lindo E, Santisteban-Ponce J, Chea-Woo E, Gutierrez M. 2000.** Racecadotril in the treatment of acute watery diarrhea in children. *New England Journal of Medicine* 343: 463-467.
- **Salazar-Lindo E, Miranda-Langschwager P, Campos-Sanchez M, Chea-Woo E, Bradley SR. 2004.** Lactobacillus casei strain GG in the treatment of infants with acute watery diarrhea: A randomized, double-blind, placebo controlled clinical trial (ISRCTN67363048). *BMC Pediatrics*.
- **Sambrook J, Fritsch FE, Maniatis T. 1989.** Molecular cloning: a laboratory manual. Vol. 2. 2da ed. p 14.6-14.20. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A
- **Sandvig K, Van Deurs B. 2002.** Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. *FEBS Lett.* 529: 49 – 53.
- **Scheutz F, Cheasty T, Woodward D, Smith H. 2004.** Designation of O174 and O175 to temporary O groups OX3 and OX7, and six new *E. coli* O groups that include Verocytotoxin -producing *E. coli* (VTEC): O176, O177, O178, O179, O180 and O181. *APMIS* 112: 569 – 584.
- **Schets FM, During M, Italiaander R, Heijnen L, Rutjes SA, Van der Zwaluw WK, de Roda Husman AM. 2005.** Escherichia coli O157:H7 in drinking water from private water supplies in the Netherlands. *Water Res.* 39, 4485–4493.
- **Sellers ZM, Mann E, Smith A, Ko KH, Giannella R, Cohen MB, Barrett KE, Dong H. 2008.** Heat – stable enterotoxin of *Escherichia coli* (STa) can stimulate duodenal HCO₃(-) secretion via a novel GC - C - and CFTR - independent pathway. *FASEB J.* 22: 1306 – 1316.
- **Silvera E, Perales R, Rodriguez J, Lopez UT, Gavidia C, Agapito PJ, Palacios EC. 2012.** Presencia de Escherichia coli O157 en Crias de Alpacas (Vicugna pacos). *Rev Inv Vet Peru.* 23 (1): 98-104

- **Sinclair JF, Dean - Nystrom EA, O'Brien AD. 2006.** The established intimin receptor Tir and the putative eucaryotic intimin receptors nucleolin and beta1 integrin localize at or near the site of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adherence to enterocytes *in vivo*. Infect. Immun. 74: 1255 – 1265.
- **Sinnecker, H. 1976.** The basic epidemic or epizootic process. In: General Epidemiology. John Wiley & Sons Ltd. London. England. pp 73-84.
- **Spano LC, Sadovsky AD, Segui PN, Saick KW, Kitagawa SM, Pereira FE, Fagundes-Neto U, Scaletsky IC. 2008.** Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with acute diarrhoea. J Med Microbiol; 57:359–63.
- **Shelton DR, Karns JS. 2001.** Quantitative detection of *Escherichia coli* O157 in surface waters by using immunomagnetic electrochemiluminescence. Appl. Environ. Microbiol. 67, 2908–2915.
- **Stephan R, Raguetti S, Untermann F. 2000.** Prevalence and Characteristics of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in stool samples from asymptomatic human carriers working in the meat processing industry in Switzerland. Journal of Applied Microbiology 33, 335-341.
- **Swerdlow DL, Woodruff BA, Brady RC, Griffin PM, Tippet S, Donnell HD Jr, Geldreich E, Payne BJ, Meyer AJr, Wells JG, et al. 1992.** A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhoea and death. Ann. Intern. Med. 117, 812–819.
- **Tamayo E, Postigo J, Del Giudice G, Rappuoli R., Benito A., Yagita H, Merino R, Merino J. 2009.** Involvement of the intrinsic and extrinsic cell - death pathways in the induction of apoptosis of mature lymphocytes by the *Escherichia coli* Heat - labile enterotoxin. Eur J Immunol 39 439-446.
- **Tauschek M, Strugnell RA, Robins – Browne RM. 2002.** Characterization and evidence of mobilization of the LEE pathogenicity island of rabbit - specific strains of enteropathogenic *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 44: 1533 – 1550.

- **Torres ME, Pérez MC, Schelotto F, Varela G, Parodi V, Allende F, Falconi E, Dell'Acqua L, Gaione P, Mendez MV, Ferrari AM, Montano A, Zanetta E, Acuña AM, Chiparelli H, Ingold E. 2001.** Etiology of children's diarrhea in Montevideo, Uruguay: associated pathogens and unusual isolates. *J Clin Microbiol* 39,2134–2139.
- **Trabulsi LR, Keller R, Tardelli Gomes TA. 2002.** Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis*; 8:508–13
- **Turner SM, Scott – Tucker A, Cooper LM, Henderson IR. 2006.** Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 263: 10 – 20.
- **Van Bost S, Roels S, Mainil J. 2001.** Necrotoxicogenic *Escherichia coli* type - 2 invade and cause diarrhoea during experimental infection in colostrum - restricted newborn calves. *Vet. Microbiol.* 81: 315 – 329.
- **Viswanathan VK, Hodges K, Hecht G. 2009.** Enteric infection meets intestinal function: how bacterial pathogens cause diarrhoea. *Nat. Rev. Microbiol.* 7: 110 – 119.
- **Veilleux S, Dubreuil JD. 2006.** Presence of *Escherichia coli* carrying the EAST1 toxin gene in farm animals. *Vet. Res.* 37: 3 – 13.
- **Watchel MR., Whitehand LC, Mandrell RE. 2002a.** Association of *Escherichia coli* O157:H7 with preharvest leaf lettuce upon exposure to contaminated irrigation water. *J. Food Prot.* 65, 18–25.
- **Watchel MR, Whitehand LC, Mandrel RE. 2002b.** Prevalence of *Escherichia coli* associated with a cabbage crop inadvertently irrigated with partially treated sewagewastewater. *J. Food. Prot.* 65, 471–475.
- **Werber, D., A. Fruth, U. Buchholz, R. Prager, M. H. Kramer, A. Ammon, and H. Tschape. 2003.** Strong association between Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and virulence genes *stx2* and *eae* as possible explanation for predominance of serogroup O157 in patients with haemolytic uraemic syndrome. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 22:726-730.

- **Wheeler J. 1991.** Origen, evolución y status actual. En: Fernández-Baca S (ed). Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. Santiago de Chile: FAO. p 11-48.
- **Whitfield C, Keenleyside WK, Clarke BR. 1994.** Structure, function and synthesis of surface polysaccharides in *Escherichia coli*. In *Escherichia coli* in domestic animals and humans. C. L. Gyles (ed.). Wallingford, Oxon: CAB International, pp. 437 – 494.
- **Whitehead CE, Anderson DE. 2006.** Neonatal diarrhea in llamas and alpacas. Small Rumin. Res 2005; 61:207-215.
- **[VLA] Veterinary Laboratories Agency. 2009.** Non-Statutory Zoonoses. Quarterly Report July – September. [Internet], [28 abril 2009]. Disponible en: www.defra.gov.uk/vla/reports/docs/rep_zoo0308.pdf
- **Zhu C, Harel J, Jacques M, Desautels C, Donnenberg MS, Beaudry M, Fairbrother JM. 1994.** Virulence properties and attaching – effacing activity of *Escherichia coli* O45 from swine postweaning diarrhea. Infect. Immun. 62: 4153 – 4159.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Relación de número de animales y niños positivos a cepas patógenas de *E. coli* por familia.

n₁: número total de alpacas muestreados por familia; **n₂:** número total de niños muestreados por familia

Familia 1: n₁: 12 animales; n₂: 1 niño		
Nº muestra Alpacas	Genes detectados	Patotipo de <i>E. coli</i>
1	<i>eae (bfp-)</i>	1 EPEC atípica
2	<i>eae (bfp-)</i>	2 EPEC atípica
3	<i>eae (bfp+), eae (bfp-)</i>	1 EPEC típica, 1 EPEC atípica
4	<i>stx2(eae)</i>	1 EHEC
5	<i>eae (bfp+)</i>	1 EPEC típico
6	<i>eae (bfp-)</i>	1 EPEC atípica
7	<i>eae (bfp-)</i>	2 EPEC atípica
8	<i>eae (bfp+), eae (bfp-)</i>	1 EPEC típica, 1 EPEC atípica
9	<i>eae (bfp+)</i>	1 EPEC típica

Familia 2: n₁: 11 animales; n₂: 2 niños		
Nº muestra Alpacas	Genes detectados	Patotipo de <i>E. coli</i>
1	<i>eae (bfp+), eae (bfp-)</i>	2 EPEC típicas y 1 EPEC atípica
2	<i>eae (bfp+)</i>	2 EPEC típicas
3	<i>eae (bfp+)</i>	3 EPEC típicas
4	<i>eae (bfp-)</i>	1 EPEC atípica
5	<i>eae (bfp-)</i>	2 EPEC atípicas
6	<i>eae (bfp-)</i>	2 EPEC atípicas
7	<i>eae (bfp+), eae (bfp-)</i>	1 EPEC típica y 1 EPEC atípica
Nº muestra Niño	Genes detectados	Patotipo de <i>E. coli</i>
1	<i>stx1(eae+), lt</i>	1 EHEC, 1 ETEC
2	<i>eae (bfp+)</i>	1 EPEC típica

Familia 3: n₁: 9 animales; n₂: 1 niño		
Nº muestra Alpacas	Genes detectados	Patotipo de <i>E. coli</i>
1	<i>eae (bfp-), stx2(eae+)</i>	2 EPEC atípicas y 1 EHEC
2	<i>eae (bfp-)</i>	1 EPEC atípica
3	<i>stx2(eae+)</i>	1 EHEC
4	<i>eae (bfp-)</i>	1 EPEC atípica
5	<i>stx1 (eae+)</i>	1 EHEC

Familia 4: n₁: 9 animales; n₂: 2 niños		
Nº muestra Alpacas	Genes detectados	Patotipo de <i>E. coli</i>
1	<i>eae (bfp-)</i>	1 EPEC atípica
2	<i>eae (bfp+)</i>	1 EPEC típica
3	<i>eae(bfp-)</i>	1 EPEC atípica

Familia 5: n₁: 9 animales; n₂: 2 niños		
Nº muestra Alpacas	Genes detectados	Patotipo de <i>E. coli</i>
1	<i>Stx2(eae+)</i>	2 EHEC

Familia 6: n₁:12 animales; n₂: 2 niños		
Nº muestra Alpacas	Genes detectados	Patotipo de <i>E. coli</i>
1	<i>stx2(eae-), eae(bfp-)</i>	2 EHEC, 1 EPEC atípica
2	<i>eae(bfp-)</i>	3 EPEC atípicas
3	<i>eae(bfp-)</i>	2 EPEC atípicas
4	<i>eae(bfp-)</i>	1 EPEC atípica
5	<i>eae(bfp-)</i>	1 EPEC atípica
6	<i>stx2(eae-), eae(bfp+)</i>	1 EHEC, 1 EPEC atípica
7	<i>eae(bfp-)</i>	1 EPEC atípica
Nº muestra Niño	Genes detectados	Patotipo de <i>E. coli</i>
1	<i>eae (bfp+)</i>	3 EPEC típicas

Familia 7: n₁: 10 animales; n₂: 2 niños		
Nº muestra Alpacas	Genes detectados	Patotipo de <i>E. coli</i>
1	<i>eae(bfp-), eae(bfp+)</i>	1 EPEC atípica, 1 EPEC típica
2	<i>eae(bfp-)</i>	2 EPEC atípica
3	<i>eae(bfp-), eae(bfp+)</i>	1 EPEC atípica, 1 EPEC típica
4	<i>eae(bfp-)</i>	1 EPEC atípicas
5	<i>eae(bfp+)</i>	1 EPEC típica
6	<i>eae(bfp-), eae(bfp+)</i>	1 EPEC atípica, 1 EPEC típica
7	<i>eae(bfp-), eae(bfp+)</i>	1 EPEC atípica, 1 EPEC típica
8	<i>eae(bfp-), eae(bfp+)</i>	1 EPEC atípica, 2 EPEC típicas
Nº muestra Niño	Genes detectados	Patotipo de <i>E. coli</i>
1	<i>eae(bfp-)</i>	2 EPEC atípicas

